
Modellierung der DNA-Schadenscluster-, Zellzyklus- und Reparaturweg-abhängigen Strahlenempfindlichkeit nach niedrig- und hoch-LET-Bestrahlung

Modeling of DNA damage-cluster, cell-cycle and repair pathway dependent radiosensitivity
after low- and high-LET irradiation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation von Dipl.-Phys. Paul Günther aus Karaganda in Kasachstan

Tag der Einreichung: 12.06.17, Tag der Prüfung: 17.07.17

Darmstadt 2017 — D 17

1. Gutachten: Prof. Dr. Marco Durante
2. Gutachten: Prof. Dr. Barbara Drossel



TECHNISCHE
UNIVERSITÄT
DARMSTADT

Fachbereich Physik
Institut für Festkörperphysik

Modellierung der DNA-Schadenscluster-, Zellzyklus- und Reparaturweg-abhängigen Strahlenempfindlichkeit nach niedrig- und hoch-LET-Bestrahlung
Modeling of DNA damage-cluster, cell-cycle and repair pathway dependent radiosensitivity after low- and high-LET irradiation

Genehmigte Dissertation von Dipl.-Phys. Paul Günther aus Karaganda in Kasachstan

1. Gutachten: Prof. Dr. Marco Durante
2. Gutachten: Prof. Dr. Barbara Drossel

Tag der Einreichung: 12.06.17

Tag der Prüfung: 17.07.17

Darmstadt 2017 — D 17

Erklärung zur Dissertation

Hiermit versichere ich, die vorliegende Dissertation ohne Hilfe Dritter nur mit den angegebenen Quellen und Hilfsmitteln angefertigt zu haben. Alle Stellen, die aus Quellen entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht. Diese Arbeit hat in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner Prüfungsbehörde vorgelegen.

Darmstadt, den 12.06.17

(Dipl.-Phys. Paul Günther)



Diese Arbeit befasst sich mit der Modellierung der Wirkung ionisierender Strahlung auf Zellen. Im Fokus steht der Einfluss der Verfügbarkeit von DNA-Reparaturwegen und der Strahlenqualität auf die Zellüberlebenswahrscheinlichkeit. Die Verfügbarkeit der DNA-Reparaturwege hängt vom Zellreplikationsstatus oder mutationsbedingten Defekten der Reparaturwege ab. Die Strahlenqualität äußert sich im mikroskopischen Ionisationsmuster, welches zu DNA-Schäden führt.

Das *Giant Loop Binary LEsion Model* (GLOBLE-Modell) und das *Local Effect Model* (LEM) beschreiben das Zellüberleben nach Photonen- bzw. Ionenbestrahlung. Beide gehen davon aus, dass das Zellüberleben aus der räumlichen Verteilung von Doppelstrangbrüchen (DSB) – dem Schadensmuster – der DNA auf einer Chromatin-Struktur höherer Ordnung vorhergesagt werden kann. Einzelne DSB werden hierbei als isolierte DSB (iDSB) und zwei oder mehr nah beieinander liegende (innerhalb von ca. 540 nm) DSB werden als geclusterte DSB (cDSB) bezeichnet. Das GLOBLE-Modell berücksichtigt verschiedene iDSB-Reparaturwege sowie deren Verfügbarkeit, um das zellzyklusspezifische Überleben vorherzusagen. Die zentrale Annahme des LEM ist, dass unabhängig von der Strahlenqualität gleiche Schadensmuster zum gleichen Effekt führen. Um das Schadensmuster zu bestimmen, wird die lokale Dosisdeposition von Ionen mithilfe der amorphen Bahnstruktur ausgewertet. Das Zellüberleben nach Ionenbestrahlung wird dann aus einem Vergleich mit Schadensmustern nach Photonenbestrahlung vorhergesagt.

Zellüberlebenskurven nach hohen Dosen Photonenstrahlung lassen sich nicht durch das LinearQuadratische-Modell (LQ-Modell) beschreiben, da diese bei hohen Dosen eine nahezu lineare Abhängigkeit von der Dosis aufweisen. In dieser Arbeit wird das GLOBLE-Modell angewendet, um eine neuartige mechanistische Methode zur Bestimmung der Übergangsdosis aus der LQ-Form von Überlebenskurven im Niedrigdosisbereich in eine lineare Form im Hochdosisbereich zu entwickeln.

Weiterhin wird eine Methode vorgestellt, die es erlaubt Überlebensvorhersagen synchroner Zellen mittels LEM von Photonen- auf Ionenstrahlung zu übertragen. Diese Methode ist in der Lage, den Einfluss des Zellzyklus und den der Strahlenqualität auf die Radiosensitivitäten quantitativ vorherzusagen. Für die LEM-Vorhersage der relativen biologischen Wirksamkeit (RBE) werden zwei Ansätze verglichen. Der erste Ansatz sagt die RBE auf Basis des Überlebens asynchroner Zellen vorher. Der zweite Ansatz sagt den RBE aus der Summe des Überleben einzelner Subpopulationen, aus denen eine asynchrone Zellpopulation besteht, vorher. Beide Ansätze führen zum gleichen qualitativen Ergebnis. Weiter wird gezeigt, dass das GLOBLE-Modell und LEM in der Lage sind, die Auswirkung von Defiziten der DNA-Reparaturwege auf das Zellüberleben nach niedrig- und hoch-LET-Bestrahlung vorherzusagen.

Im Zusammenhang der Beschreibung von Ionenspuren durch die amorphe Bahnstruktur befasst sich diese Arbeit mit zwei Fragen: 1. Kann die Beschreibung des Zellüberlebens nach Schwerionenbestrahlung durch eine genauere Betrachtung der Verhältnisse des direkten und indirekten Effekts verbessert werden? 2. Erlaubt die amorphe Bahnstruktur eine angemessene Beschreibung der Dosisdeposition? Letzteres zielt auf die Frage ab, ob die DNA-Schadensinduktion auf der nm-Skala durch die amorphe Bahnstruktur beschrieben werden kann, oder ob einzelne Ionisationen betrachtet werden müssen. In Bezug auf die erste Frage wird dargelegt, dass eine detailliertere Beschreibung der direkten und indirekten Beiträge zu einer genaueren Vorhersage der experimentellen Daten führt. Bei der Beantwortung der zweiten Frage wird gezeigt, dass mit der Methode der amorphen Bahnstruktur DNA-Schadenscluster auf der nm-Skala ähnlich zu einer *ab initio* Monte-Carlo-Simulation vorhergesagt werden können.

Im Zusammenhang der Modellierung des Zellüberlebens wird oft relevante Größenskala der DNA-Schadensclusterung diskutiert. Die im GLOBLE-Modell und LEM betrachteten iDSB und cDSB beziehen sich auf eine DNA-Schadensclusterung auf der μm -Skala. Ein weiterer Ansatz ist es, das Zellüberleben aus komplexen DNA-Schadensclustern auf der nm-Skala vorherzusagen. In dieser Arbeit wird dargelegt, dass komplexe DNA-Schadenscluster auf der μm -Skala mit denen auf der nm-Skala korrelieren. Dadurch lässt sich das Zellüberleben nach Ionenbestrahlung zum Teil auf DNA-Schadensclusterung auf beiden Skalen zurückführen. Das Zellüberleben nach Photonenbestrahlung kann jedoch nicht aus der DNA-Schadensclusterung auf der nm-Skala vorhergesagt werden.



Abstract

This work focuses on modeling of the effects of ionizing radiation on cells, primarily on, the influence of the DNA repair pathway availability and the radiation quality on the cell-survival probability. The availability of DNA repair pathways depends on the replication state and defects of the DNA repair pathways. The radiation quality manifests itself in the microscopic ionization pattern.

The Giant LOop Binary LEsion (GLOBLE) model and the Local Effect Model (LEM) describe the cell-survival after photon and ion irradiation, respectively. Both models assume that cell survival can be modeled based on the spatial distribution of Double-Strand Breaks (DSB) of the DNA (damage pattern), within a higher order chromatin structure. Single DSB are referred to as isolated DSB (iDSB) and two or more DSB in close proximity (within 540 nm) are called complex DSB (cDSB). In order to predict the cell-survival, the GLOBLE-Model considers different iDSB repair-pathways and their availability. One central assumption of the LEM is that the same damage patterns imply same effects, regardless of the radiation quality. In order to predict the damage pattern the microscopic local dose distribution of ions, described by the amorphous track structure, is evaluated. The cell survival after ion irradiation is predicted from a comparison with corresponding damage patterns after photon irradiation.

The cell-survival curves after high dose photon irradiation cannot be predicted from the Linear Quadratic (LQ) Model due to their transition towards a linear dose dependence. This work uses the GLOBLE-Model to introduce a novel mechanistic approach, which allows the threshold dose to be predicted for the transition from a linear quadratic dose dependence, of survival curves at low doses, to a linear dose dependence at high doses.

Furthermore, a method is presented, which allows LEM to predict the survival of synchronous cells after ion irradiation based on the cell survival after photon irradiation. This method is able to qualitatively predict the influence of the cell-cycle and the radiation quality on radiosensitivity. Based on this, two approaches for the LEM prediction of the Relative Biological Effectiveness (RBE) are compared. The first approach predicts the RBE based on the survival of asynchronous cells. The second approach predicts the RBE from the sum of survival curves of the subpopulations, which contribute to the asynchronous cell population. Both approaches lead to qualitatively similar results.

In the context of describing the microscopic dose deposition of ion irradiation by the amorphous track structure, two questions are addressed: 1. Is it possible to improve the prediction of cell survival after ion irradiation by a more sophisticated composition of the direct and indirect effect? 2. is the amorphous track structure an appropriate model of the dose deposition regarding the DNA damage clustering on the nm-scale or is it necessary to evaluate single ionizations on the molecular level? Regarding the first question, it is shown that a more detailed evaluation of the direct and indirect effect improves the agreement of the LEM predictions to data. Concerning the second question, it is shown that the amorphous track structure can be used for the prediction of DNA damage induction on the nm-scale similar to an ab initio Monte Carlo simulation.

In the context of cell-survival modeling, the relevant length scale for DNA damage-clustering is often discussed. The iDSBs und cDSBs used in the GLOBLE and LEM are referring to DNA damage clustering on the μm -scale. There are also models which predict the cell survival after ion irradiation based on complex DNA-damage-clusters on the nm-scale. This work shows, that complex DNA damage-clusters on the μm -scale are correlated to damage clusters on the nm-scale. Therefore, it is possible to predict the cell survival after ion irradiation based on both scales. However, the cell survival after photon irradiation cannot be predicted based on damage-clusters on the nm-scale.



1	Einleitung	1
2	Theoretische Grundlagen	5
2.1	Ionisierende Strahlung	5
2.1.1	Photonenstrahlung	5
2.1.2	Ionenstrahlung	6
2.1.3	Indirekter Strahlungseffekt	8
2.2	Radiobiologie	9
2.2.1	Zellen	9
2.2.2	Strahleninduzierte zelluläre Effekte und DNA-Schäden	11
2.2.3	DNA-Reparaturwege	12
2.2.4	Zellüberleben	14
2.3	Radiobiologische Modelle	15
2.3.1	Das linearquadratisch-lineare Modell	19
2.3.2	Das <i>Giant Loop Binary Lesion Model</i>	19
2.3.3	Das <i>Local Effect Model</i>	22
2.3.4	Relative biologische Wirksamkeit	24
2.3.5	Ein <i>ab initio</i> Modell der DNA-Schadensinduktion durch geladene Teilchen	24
3	Methoden	27
3.1	Modellierung des Zellüberlebens	27
3.1.1	Parametrisierung von Zellpopulationen	27
3.1.2	Vorhersage von Zellüberleben durch das GLOBLE-Modell	29
3.1.3	Mathematische Aufbereitung von Überlebenskurven	30
3.1.4	Simultane Funktionsanpassung	30
3.1.5	Darstellung des Überlebens als Funktion der Zeit	31
3.1.6	Berücksichtigung von Reperaturdefiziten durch das GLOBLE-Modell	31
3.1.7	Modifikationen des GLOBLE-Modells	31
3.1.8	LEM-Vorhersage des Überlebens synchroner Zellen nach Ionenbestrahlung	33
3.1.9	Transformation vom GLOBLE- zum LQ- und LQL-Modell	34
3.2	Zellexperimente	36
3.2.1	Durchflusszytometrische Messung der Zellzyklusverteilung	36
3.2.2	Synchronisation von CHO-Zellen durch Kontaktinhibition	36
3.2.3	Klonogener Überlebensassay	37
3.2.4	Der MCP-Assay	37
3.2.5	Anpassung des LQL-Modells an Daten des klonogenen- und MCP-Assay	39
3.3	Amorphe Bahnstruktur und DNA-Schadensclustering auf der nm-Skala	39
3.3.1	Beiträge des direkten und indirekten Effekts	40
3.3.2	Simulation von DNA-Schadensclustern auf der nm-Skala mithilfe der amorphen Bahnstruktur	41
4	Modellierung des Zellüberlebens	43
4.1	Ergebnisse	43
4.1.1	Modellierung des Überlebens synchroner Zellen nach Photonenbestrahlung	43
4.1.2	Modellierung des Überlebens reparaturdefizienter Zellen	51
4.1.3	Extrapolation des Zellüberlebens zur Hochdosisbestrahlung	54
4.1.4	Zellüberleben asynchroner und synchroner CHO-Zellen nach Hochdosisbestrahlung	59
4.1.5	Modellierung des Überlebens synchroner Zellen nach Ionenbestrahlung	68

4.1.6	Modellierung der RBE reparaturdefizienter Zellen nach Ionenbestrahlung	73
4.2	Diskussion	75
4.2.1	Zellzyklusspezifisches Überleben nach Photonen- und Ionenbestrahlung	75
4.2.2	Einfluss von DNA-Reparaturdefiziten auf das Zellüberleben	80
4.2.3	Vergleich zu anderen Modellen	81
5	Untersuchungen zur amorphen Bahnstruktur	85
5.1	Ergebnisse	85
5.1.1	Einfluss des indirekten Effekts auf die RBE von Ionenstrahlung	85
5.1.2	Vergleich der amorphen Bahnstruktur mit einem <i>ab initio</i> Modell	87
5.2	Diskussion	92
5.2.1	Optimierung der amorphen Bahnstruktur zur Vorhersage der RBE von Kohlenstoffstrahlung	92
5.2.2	Amorphe Bahnstruktur als Näherung der mikroskopischen Dosisverteilung und die Relevanz der Schadensclusterung auf der μm -Skala	93
6	Fazit und Ausblick	99
	Literaturverzeichnis	103
	Abkürzungsverzeichnis	111

1 Einleitung

Ionisierende Strahlung bietet ein breites Anwendungsspektrum für die Medizin. So wird zum Beispiel Röntgenstrahlung seit ihrer Entdeckung 1896 für medizinische Diagnosen und zur Therapie von Erkrankungen eingesetzt. Ein wichtiges Anwendungsgebiet ist die Tumorthherapie, bei der in über 50 % der Fälle Radiotherapie zum Einsatz kommt. Neben der konventionellen Radiotherapie mit Photonenstrahlung, ist diese ebenso mit Ionenstrahlung möglich. Diese ist aufgrund der komplexeren Umsetzbarkeit und der hohen Kosten noch nicht so verbreitet wie die konventionelle Radiotherapie mit Photonen, bietet jedoch viele Vorteile. Aufgrund der physikalischen Eigenschaften der Ionenstrahlung lässt sich die Dosis besser auf den Tumor fokussieren, sodass weniger Dosis im umliegenden Gewebe deponiert wird. Schwere Ionen zeigen zusätzlich eine höhere biologische Wirksamkeit im Zielvolumen als im Eingangskanal [1]. Diese Eigenschaften lassen sich nutzen, um höhere Erfolgschancen einer Therapie mit weniger Nebenwirkungen zu erzielen. Zusätzlich ist können Tumore mit Ionenstrahlung behandelt werden, die aufgrund ihrer anatomischen Lage sonst nicht behandelbar wären [2].

Für erfolgreiche radiotherapeutische Anwendungen ist die Kenntnis von Dosis-Effekt-Beziehungen erforderlich. Die zwei wichtigen Größen für die Anwendung sind die Tumorkontrolle (engl. *Tumor Control Probability*, TCP) und die Normalgewebekomplikationswahrscheinlichkeit (engl. *Normal Tissue Complication Probability*, NTCP). Die Dosis ist der wichtigste physikalische Faktor der den biologische Effekt von Photonenbestrahlung bestimmt. Bei Ionenstrahlung hängt der Effekt zusätzlich von der Ionensorte und Ionenenergie ab. Da die Ionen im Zielvolumen stoppen, resultiert aus der Energieabhängigkeit eine Ortsabhängigkeit des biologischen Effekts im Strahlungsfeld. Der Effekt im Eingangskanal kann sich stark von dem im Zielvolumen unterscheiden. Daraus resultieren komplexe Zusammenhänge zwischen Dosis, Strahlenqualität und den biologischen Effekten. Da eine experimentelle Messung aller Dosis-Effekt-Beziehungen im erforderlichen Umfang jedoch nicht praktikabel ist, wird ein Modell zur Vorhersage der Dosis-Effekt-Beziehungen benötigt. Um verschiedene Strahlenqualitäten miteinander vergleichen zu können, wird die relative biologische Wirksamkeit (engl. *Relative Biological Effectiveness*, RBE) als Hilfsmittel benutzt. Dafür werden Dosis-Effekt-Beziehungen unterschiedlicher Strahlenqualitäten aufeinander bezogen, um RBE gewichtete Dosen bestimmen zu können. Die RBE gewichtete Dosis gibt an, welche Dosis Photonenstrahlung zum gleichen biologischen Effekt¹ führt. Ein wichtiger Vorteil hiervon ist, dass die vielen Erfahrungswerte aus der Radiotherapie mit Photonenstrahlung genutzt werden können, welche für die Ionentherapie in dem Umfang nicht vorhanden sind. Im Umfeld der Vorhersage der RBE von Ionenstrahlung existieren mehrere Modelle. Die mikroskopische Dosisdeposition ist ein gemeinsamer Ansatzpunkt vieler Modelle. Photonenstrahlung wird als homogen und dünnionisierend angenommen. Ionenstrahlung zeigt hingegen ein weites Spektrum von homogen und dünnionisierend bis inhomogen und dictionisierend. Deshalb wird von vielen Modellen die mikroskopische räumliche Dosisverteilung untersucht, die dafür relevante Größenordnung ist die nm-Skala. Die Art der Betrachtung der Dosisdeposition ist ein wichtiges Merkmal, in dem sich die Modelle oft unterscheiden. Einige Modelle betrachten den Mittelwert der deponierten spezifischen Energie der Ionenspuren, auch amorphe Bahnstruktur genannt. Andere Modelle berücksichtigen wiederum jede einzelne Ionisation sowie die darauf folgende zeitliche Entwicklung der ionisierten Moleküle. Die radiobiologischen Modelle unterscheiden sich auch in den betrachteten biologischen Endpunkten. Für die Anwendung der Radiotherapie

¹ Der in dieser Arbeit betrachtete Effekt ist das Zellüberleben.

wird oft das Zellüberleben als Modell der TCP verwendet. Dafür wird betrachtet, wie viele Zellen 1-2 Wochen nach Bestrahlung Kolonien von mehr als 50 Zellen bilden können. Das ist ein nützliches Assay, um Dosis-Überleben-Beziehungen in Form von Überlebenskurven zu bestimmen. Neben dem Überleben können auch andere Prozesse, welche einer Bestrahlung folgen, wie z. B. Induktion und Reparatur von Schäden, untersucht werden. Diese finden auf Zeitskalen von wenigen Minuten bis Stunden nach Bestrahlung statt. Diese Arbeit befasst sich mit den Modellen, die das Zellüberleben nach Bestrahlung modellieren, es werden jedoch auch Modelle aufgeführt, die versuchen alle experimentell zugänglichen Effekte miteinzubeziehen.

Um Dosiseffektcurven ionisierender Strahlung zu beschreiben, wird häufig das Linear-Quadratische-Modell (LQ-Modell) verwendet. Dabei handelt es sich zunächst um eine rein empirische Beschreibung der Dosiseffektcurven. Das *Giant LOop Binary LEsion Model* (GLOBLE-Modell) nutzt zur Vorhersage von Dosiseffektcurven einen mechanistischen Ansatz. Es wird das induzierte Schadensmuster, genauer die räumliche Verteilung von Doppelstrangbrüchen (DSB) auf der DNA, ausgewertet. Einzelne DSB werden als isolierte DSB (iDSB) und nah beieinanderliegende als geclusterte DSB (cDSB) bezeichnet [3]. Zusätzlich wird die Verfügbarkeit von DNA-Reparaturwegen betrachtet. Dadurch kann z. B. der Einfluss des Zellzyklus auf die Dosiseffektcurven vorhergesagt werden [4]. Normalerweise sind die Zellen einer Kultur über den gesamten Zellzyklus verteilt. Durch eine Synchronisation der Zellen können diese einer bestimmten Phase des Zellzyklus akkumuliert werden. Zellzyklusspezifische Eigenschaften lassen sich folglich in Experimenten mit synchronen Zellen untersuchen.

Das LQ- und GLOBLE-Modell beschreiben Dosiseffektcurven im Dosisbereich 0-10 Gy. Dieser Bereich ist experimentell gut zugänglich und deckt einen Großteil klinisch relevanter Anwendungen ab. Für hohe Dosen zeigen Zellüberlebenskurven eine Reduktion des quadratischen Anteils oder sogar einen Übergang in eine rein lineare Form [5]–[10]. Gleichzeitig sind Zellüberlebenskurven bei hohen Dosen schwieriger zu messen. Deren Kenntnis wird für therapeutische Anwendungen mit hohen Dosen (≈ 60 Gy) Photonenstrahlung benötigt. Für hohe Dosen können die Dosiseffektcurven durch das Linear-Quadratisch-Lineare-Modell (LQL-Modell) [11] angenähert werden. Der Übergang von einer linear-quadratischen in eine lineare Form wird oft durch die heterogene Radiosensitivität der Subpopulationen erklärt [5]–[7]. Die Subpopulationen beziehen sich darauf, dass Zellkulturen zumeist Zellen in verschiedenen Zellzyklusphasen enthalten, welche unterschiedlichen Dosiseffektcurven aufweisen. Die Dosiseffektcurven der Subpopulationen folgen dabei dem LQ-Modell [5]–[7]. Eine umfassende mechanistische Erklärung des Sachverhalts steht jedoch noch aus. Das GLOBLE-Modell eignet sich nun dafür, die zugrunde liegende Systematik zu untersuchen, da es zellzyklusspezifische Überlebenskurven vorhersagen kann.

Um die RBE von Ionenstrahlung für die Planung einer Radiotherapie vorherzusagen wurde das *Local Effect Model* (LEM) [11]–[15] entwickelt. Die RBE wird dabei aus Dosiseffektcurven nach Photonenstrahlung vorhergesagt. Dafür wird angenommen, dass der biologische Effekt vom Schadensmuster abhängt, wobei die Dosis und die Strahlenqualität das Schadensmuster bestimmen [14]. Die mikroskopische Dosisverteilung der Ionen wird durch die amorphe Bahnstruktur modelliert. Basierend darauf wird das erwartete Schadensmuster simuliert. Anschließend wird über einen Vergleich der Schadensmuster der äquivalente Effekt nach Photonenstrahlung ausgewertet. Dies wurde bisher nur für asynchrone Zellkulturen durchgeführt [14].

Das Interesse am zellzyklusspezifischen Überleben nach Bestrahlung beruht auf dessen therapeutischer Relevanz [4]. Während der Zellzyklusphase, in welcher die DNA repliziert wird, sind Zellen resistent gegenüber Photonenstrahlung, jedoch anfälliger gegenüber Ionenstrahlung [16], [17]. Für eine gezielte Ausnutzung dieses Effekts ist zunächst eine Beschreibung dieses Übergangs erforderlich. Das GLOBLE-Modell und das LEM werden in dieser Arbeit benutzt, um diesen Effekt nachzubilden.

Das GLOBLE-Modell und das LEM benutzen zur Vorhersage des Zellüberlebens beide zwei Schadensklassen, die iDSB und cDSB. Diese werden auch als DSB-Cluster auf der μm -Skala bezeichnet. Andere Theorien nehmen an, dass die *Locally Multiple Damaged Sites* (LMDS) oder *Regionally Multiple Damaged Sites* (RMDS) Schadenscluster auf der nm-Skala über das Zellüberleben entscheiden [18]–[24]. Die Annahme einer Größenskala ist oft mit einer Betrachtungsweise der mikroskopischen Dosisverteilung korreliert. So betrachten *ab initio* Modelle [22], [23], [25]–[28], welche die Schadensinduktion von Ionenstrahlung auf Basis einzelner Ionisationen auswerten, oft die Schadensclusterung auf der nm-Skala. Es wird argumentiert, dass die *ab initio* Modelle eine höher aufgelöste Betrachtung der physikalischen Prozesse zu einer genaueren Vorhersage des biologischen Effekts führen kann [29].

Das Ziel dieser Arbeit ist es, das Verständnis der Mechanismen zu erweitern, welche das Zellüberleben nach Bestrahlung mit ionisierender Strahlung bestimmen. Untersucht wird der Einfluss von Photonen- und Ionenstrahlung auf das Überleben synchroner Zellen im Zusammenhang mit der Verfügbarkeit von DNA-Reparaturwegen. In Bezug auf die Ionenstrahlung wird die Beschreibung der Dosisdeposition durch die amorphe Bahnstruktur sowie die Relevanz von DNA-Schadensclustern unterschiedlicher Größenordnung untersucht. Dabei wird geprüft, inwieweit sich unterschiedliche Modellvorstellungen vereinen lassen. Die Untersuchungen in dieser Arbeit stellen Grundlagenforschung auf dem Gebiet der Strahlenbiophysik dar, ohne eine direkte Anbindung an klinische Anwendungen. Im Kontext des LEM ist es jedoch wichtig, die klinische Anwendung zu berücksichtigen, da es für diese entwickelt wurde. Dementsprechend spielt die Anwendung des LEM eine wichtige Rolle bei der Einordnung in die Bandbreite der vorgestellten Modelle.

Im Folgenden werden zuerst die theoretischen Hintergründe dieser Arbeit erörtert: 1. die physikalischen Eigenschaften ionisierender Strahlung, 2. die Strahlenwirkung auf Zellen und 3. die betrachteten radiobiologischen Modelle. Anschließend dazu werden Methoden der Modellierung und experimentelle Methoden zur Messung des Zellüberlebens dargelegt. Darauf folgen zwei Ergebnis-Diskussions-Blöcke. Der Schwerpunkt des ersten Blocks liegt auf der Modellierung des zellzyklusspezifischen Überlebens nach Photonen- und Ionenbestrahlung. Ebenso wird der Einfluss von Reparaturdefiziten untersucht. Der zweite Block befasst sich mit der Beschreibung der Dosisdeposition amorpher Bahnstrukturen, sowie der Relevanz von DNA-Schadensclustern auf der nm- und μm -Skala.



2 Theoretische Grundlagen

Dieses Kapitel gibt im ersten Teil eine Beschreibung der physikalischen Eigenschaften ionisierender Strahlung und es werden die Unterschiede zwischen Photonen und Ionenstrahlung beleuchtet. Im zweiten Teil werden grundlegende Eigenschaften von Zellen und die Effekte ionisierender Strahlung auf diese beschrieben. Abschließend werden radiobiologische Modelle vorgestellt, welche die Zellüberlebenswahrscheinlichkeit nach Bestrahlung modellieren.

2.1 Ionisierende Strahlung

Elektromagnetische Strahlung wird als ionisierend bezeichnet, wenn sie in der Lage ist, Wasser zu ionisieren. Die dafür benötigte Energie beträgt im Mittel 30 eV. Wasser wird im Folgenden als Referenztarget verwendet, da es den größten Teil des menschlichen Körpers ausmacht. Die makroskopisch deponierte Dosis D ist

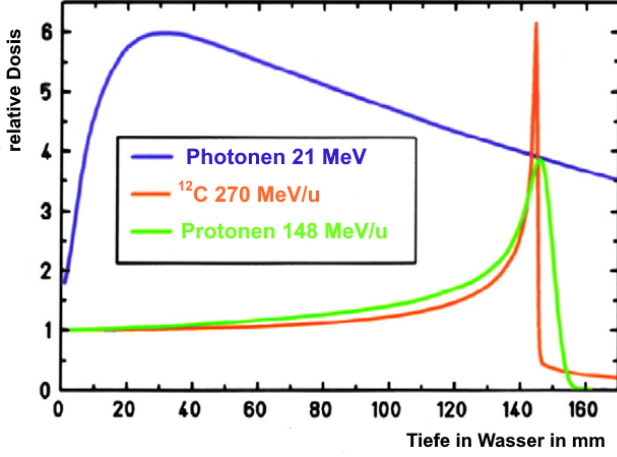
$$D = \frac{dE}{dm} \quad (1)$$

mit der deponierten Energie E pro Masse m . Die Einheit der Dosis ist Gray ($[D] = \text{Gy} = \text{J/kg}$). Die biologische Wirksamkeit ionisierender Strahlung hängt nicht nur von der makroskopischen Dosis ab, sondern auch von der mikroskopischen Dosisverteilung. Die Eigenschaften mikro- und makroskopischer Dosisverteilung der Photonenstrahlung wird in Kapitel 2.1.1 beschrieben und die der Ionenstrahlung in 2.1.2.

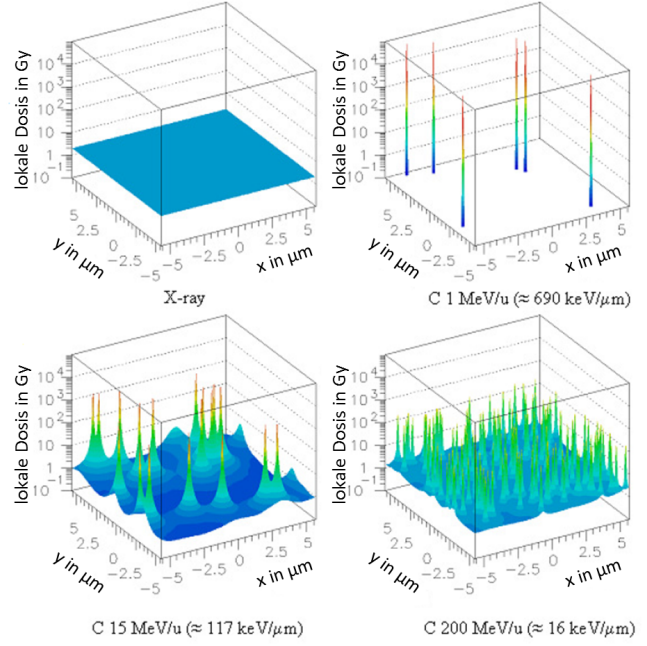
2.1.1 Photonenstrahlung

Photonen deponieren den Großteil ihrer Energie in Materie über drei Interaktionsprozesse: den photoelektrischen Effekt, Compton-Streuung und Paarbildung. Der photoelektrische Effekt dominiert im unteren Energiebereich ($E < 30 \text{ keV}$). Dabei werden Photonen, unter Emission von Elektronen, von Atomen absorbiert. Bei der Compton-Streuung handelt es sich um die inelastische Streuung der Photonen an Elektronenhüllen von Atomen, bei der Elektronen freigesetzt werden. Diese Art der Wechselwirkung dominiert im mittleren Energiebereich ($30 \text{ keV} < E < 30 \text{ MeV}$) und ist die dominierende Photonen-Materie-Wechselwirkung der Strahlenbiophysik. Die wahrscheinlichste Art der Interaktion hochenergetischer Photonen mit Materie ist die Paarbildung. Bei dieser wandelt sich ein Photon in ein Elektronen-Positron-Paar um, welches wiederum durch Annihilation in Photonen zerfällt.

Die makroskopische Tiefendosisverteilung der Photonenstrahlung nimmt in erster Näherung exponentiell mit der Tiefe in Materie ab (Abb. 1a). Der Großteil der Dosis wird jedoch von sekundären Elektronen deponiert (indirekte Ionisation). Diese unterliegen einem Aufbaueffekt, so dass das Maximum der deponierten Dosis innerhalb des bestrahlten Targets liegt. Auf der Größenordnung des Zellkerns ($10 \mu\text{m}$) verursachen die Photonen jedoch einzelne, punktuelle Ionisationen mit relativ kleiner Energiedeposition. Bei typischen therapeutischen Fraktionen mit einer Dosis von 2 Gy ist es eine gute Näherung, dass die mikroskopische Dosisverteilung auf der Größenordnung der Zellkerne konstant ist [30]. Dies ist schematisch in Abbildung 1b dargestellt.



(a) Tiefendosisprofil



(b) mikroskopische Dosisverteilung

Abbildung 1: Unterschiede der Dosisdeposition von Photonen- und Ionenstrahlung. Abbildung a: das Tiefendosisprofil der Photonenstrahlung eines 21 MeV Linearbeschleuniger, im Vergleich zu Kohlenstoffionen der Energie 270 MeV/u und Protonen mit 148 MeV/u (angepasst aus [2]). Abbildung b: die mikroskopische Dosisdeposition eines Photonenfeldes und drei Kohlenstoffionenfelder mit unterschiedlichen Ionenenergien (angepasst aus [30]).

2.1.2 Ionenstrahlung

Die Energiedeposition ($-dE/dx$) geladener Teilchen, auch LET genannt, wird durch die Bethe-Bloch-Formel beschrieben

$$-\frac{dE}{dx} = LET = 4\pi \cdot \frac{e^4}{m_e c^2} \cdot \frac{Z_{eff}^2}{\beta^2} \cdot \rho N_A \cdot \frac{Z_t}{A_t} \left[\ln \left(\frac{2m_e c^2 \beta^2}{I(1-\beta^2)} \right) - \beta^2 \right] \propto \frac{Z_{eff}^2}{\beta^2} \quad (2)$$

mit der Elementarladung e , der Elektronenmasse m_e , mit dem relativistischen β ($= v/c$, v - Geschwindigkeit, c - Lichtgeschwindigkeit), der effektiven Ladung Z_{eff} , der Dichte des Mediums ρ , der Avogadro-Konstante N_A , Ladung des Targets Z_t , atomare Masse des Targets A_t und dem mittleren Ionisationspotential I . Die effektive Ionenladung Z_{eff} ist für niedrige Energien energieabhängig und wird durch die Barkas-Gleichung

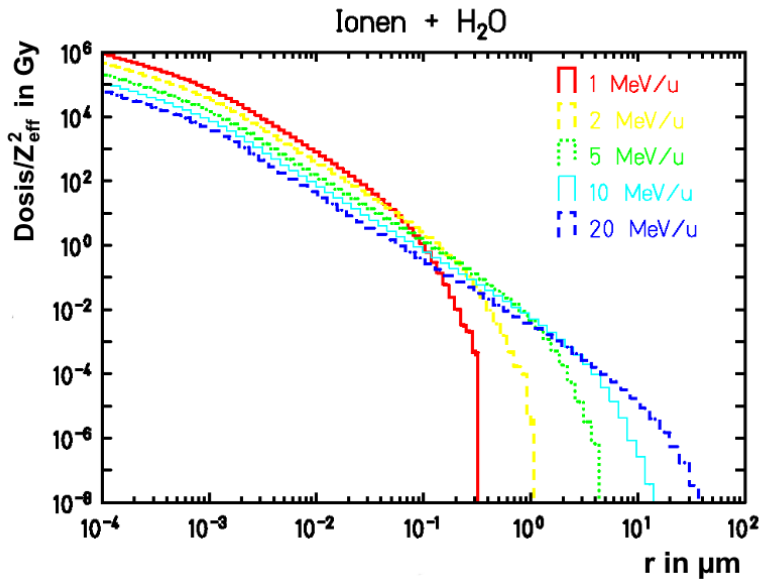
$$Z_{eff} = Z_p \left[1 - \exp \left(-125 \beta Z_p^{-\frac{2}{3}} \right) \right] \quad (3)$$

mit der Kernladungszahl des Projektils Z_p und dem relativistischen β gegeben. Die deponierte Dosis D in Gy wird mit

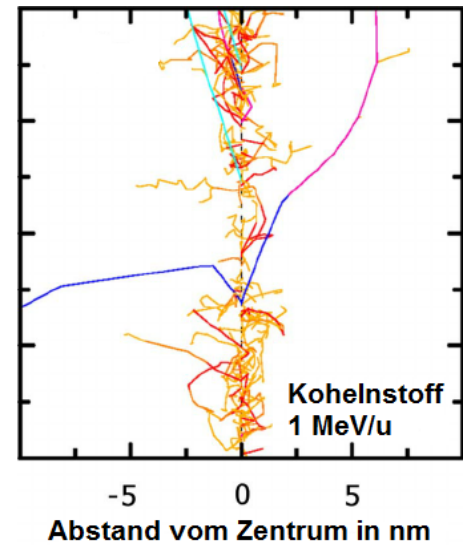
$$D = 1.602 \cdot 10^{-9} \cdot LET \cdot F \cdot \rho^{-1} \quad (4)$$

aus dem LET in $\text{keV}/\mu\text{m}$, Fluenz F in cm^{-2} und Dichte ρ in g/cm^3 berechnet. Beispielhaft ist die Tiefendosisverteilung von Protonen und Kohlenstoffionen in Abbildung 1a dargestellt. Da das Maximum der Dosis innerhalb des Targets liegt, während es sich bei Photonenstrahlung in Nähe der Oberfläche befindet, wird diese Art der Tiefendosisverteilung als inverses Tiefendosisprofil bezeichnet. Die Tiefe des Dosismaximums hängt von der Anfangsenergie der Ionen ab.

Die Art der mikroskopischen Dosisverteilung der Ionenstrahlung wird hier in niedrig- und hoch-LET-Strahlung eingeteilt. Für die typischen Ionensorten der Schwerionentherapie wie z. B. Kohlenstoff sind hohe Ionenenergien mit niedrigem LET und niedrige Energien mit hohem LET verbunden. Für schwere Elemente (z. B. Eisen) gilt ein ähnlicher Zusammenhang: hohe Energien sind mit hohem LET und niedrige Energien mit einem noch höheren LET verbunden. Abbildung 1b zeigt Beispiele der mikroskopischen Dosisverteilung von Ionen unterschiedlicher Energien. Bei einer Dosis von 2 Gy zeigt die mikroskopische Dosisverteilung der niedrig-LET-Strahlung ($200 \text{ MeV}/\text{u}$, $16 \text{ keV}/\mu\text{m}$) eine vergleichsweise homogene Dosisverteilung, die zu einem ähnlichen Effekt wie Photonenbestrahlung führt. Bei hoch-LET-Strahlung ist dies nicht mehr der Fall (Abb. 1b: ($1 \text{ MeV}/\text{u}$, $690 \text{ keV}/\mu\text{m}$; ($15 \text{ MeV}/\text{u}$, $117 \text{ keV}/\mu\text{m}$); hier kommt es dazu, dass in großen Teilen der Zelle keine Dosis deponiert wird, während an einzelnen Stellen eine sehr hohe lokale Dosis deponiert wird. Ionen erzeugen beim Durchqueren von Materie hauptsächlich niederenergetische Sekundärelektronen (δ -Elektronen), welche aufgrund ihrer geringen Reichweite ihre Dosis in der Nähe der Ionenspur deponieren. Es werden ebenfalls vereinzelt hochenergetische Sekundärelektronen (δ -Strahlen) produziert, die eine größere Reichweite haben. Der Begriff δ -Elektronen bezeichnet alle Sekundärelektronen, während δ -Strahlen sich auf die hochenergetischen Sekundärelektronen bezieht, da deren Ionisationsmuster wie eine Strahlung aussieht, welche vom Primärteilchen abgestrahlt wird. Die maximale Reichweite r_{max} der δ -Elektronen hängt von der Energie E des Ions mit $r_{\text{max}} \propto E^{1.7}$ ab [31]. Die Dosisverteilung der Ionentrajektorie, inklusive der δ -Elektronen wird im Folgenden auch als (Ionen-)Bahnstruktur bezeichnet. Die Dosisdeposition in der transversalen Ebene zur Flugrichtung des Ions (radiale Dosisverteilung) wird durch eine $1/r^2$ -Abhängigkeit von dem radialen Abstand r zum Ion beschrieben. Dabei wird die Dosis innerhalb eines inneren Radius r_{min} oft als konstant angenommen, oberhalb eines maximalen Radius r_{max} fällt der Dosisbeitrag, auf Grund der begrenzten Reichweite der δ -Elektronen, auf null ab [11], [32]–[34]. Da die Dosis eine makroskopische Größe bezeichnet, bezieht sich auf mikroskopischen Größenskalen auf die deponierte spezifische Energie. Das Konzept, die Dosisdeposition von Ionen durch die mittlere deponierte spezifische Energie als Funktion des Radius zu beschreiben, wird amorphe Bahnstruktur genannt. Die amorphe Bahnstruktur von Ionen unterschiedlicher Energien ist in Abbildung 2a dargestellt. Diese Art der Beschreibung deponierter spezifischer Energie stellt eine Abstraktion dar, bei der einzelne Ionisationen vernachlässigt und nur die mittlere Energiedeposition betrachtet wird. Die amorphe Bahnstruktur ist zur Simulation der Strahlenwirkung aus rechnerischen Gründen vorteilhaft und wird im LEM angewendet [11]–[15]. Es gibt jedoch keine vollständige Einigkeit, ob die amorphe Bahnstruktur eine angemessene Beschreibung der mikroskopischen Dosisdeposition darstellt. Die Arbeiten von Nikjoo et al. [25], [35], [36] und andere [22], [23], [26]–[28] führen deshalb ihre Simulationen auf der Ebene einzelner Ionisationen durch. Um die unterschiedliche Betrachtungsweise der Energiedeposition beider Ansätze zu verdeutlichen, ist eine Monte-Carlo Simulation einzelner δ -Elektronen eines Kohlenstoffions der Energie $1 \text{ MeV}/\text{u}$ in Abbildung 2b dargestellt.



(a) radiale Dosisverteilung



(b) einzelne Ionisationen

Abbildung 2: Mikroskopische Dosisverteilung geladener Teilchen in Wasser, auf zwei Abstraktionsebenen. Abbildung a zeigt die mittlere deponierte spezifische Energie als Funktion des radialen Abstands zum Spurzentrums, auch amorph Bahnstruktur genannt (angepasst aus Ref. [37]). Abbildung b zeigt die simulierten Sekundärelektronen von Kohlenstoffionen (angepasst aus Ref. [30]). Die verschiedenen Farben der Spuren kodieren für verschiedene Energien.

2.1.3 Indirekter Strahlungseffekt

Bei dem Mechanismus der Ionisation wird zwischen dem direkten und dem indirekten Effekt unterschieden. Als direkten Effekt bezeichnet man Ionisation durch die Photonen- oder Ionenstrahlung, oder deren Sekundärelektronen. Bei dem indirekten Effekt wird das Medium, welches zum größten Teil aus Wasser besteht, ionisiert, wodurch freie Radikale gebildet werden, u. a. auch reaktive Sauerstoffspezies (ROS, engl. *Reactive Oxygen Species*). Diese Radikale können ihrerseits molekulare Schäden verursachen. Zwischen ihrer Entstehung und ihrer Rekombination diffundieren die Radikale, wodurch eine Ausschmierung des Effekts stattfindet. Im Falle einer Bestrahlung durch Photonen erwartet man durch die Ausschmierung keine Veränderung der mikroskopischen Dosisdeposition, da diese als homogen angenommen wird. Bei der mikroskopischen Dosisdeposition der Ionenstrahlung wird eine Verbreiterung des Effekts um die Ionenbahn und damit eine Abnahme des maximalen Effekts erwartet. Wie auch bei der Betrachtung der Dosisdeposition gibt es zwei Arten, die Diffusion zu betrachten: die Nachverfolgung einzelner Moleküle während einer Zufallsbewegung oder durch eine Verbreiterung des Effekts, durch dessen Faltung mit einer zweidimensionalen Gauß-Verteilung.

Bei Photonenstrahlung wird etwa 1/3 des gesamten Effekts durch den direkten Effekt vermittelt und 2/3 durch den indirekten Effekt [38]. Bei Ionenstrahlung sind diese Verhältnisse vertauscht [39]. Die Lebensdauer und damit verbunden die mittlere Diffusionslänge sowie die Wirksamkeit der Radikale hängt vom Sauerstoffgehalt des Mediums ab. Somit wird unter hypoxischen Bedingungen die Wirksamkeit der ionisierenden Strahlung verringert, wie stark hängt jedoch von der Strahlenqualität ab. Dieser Einfluss wird als Sauerstoffeffekt bezeichnet und spielt eine wichtige Rolle in der Strahlenbiophysik.

2.2 Radiobiologie

2.2.1 Zellen

Im Kontext dieser Arbeit werden ausschließlich Säugerzellen behandelt, da nur diese relevant für die Anwendung der Strahlentherapie sind. Zellen gelten als kleinste lebende biologische Einheit, da sie sich selbstständig replizieren können. Bei Vielzellern sind die Zellen im Verbund organisiert und bilden dabei Organe, welche aus unterschiedlichen Geweben bestehen. Alle Zellen besitzen eine Membran, welche ihr Zytoplasma nach außen hin abgrenzt. Säugerzellen enthalten weiterhin viele unterschiedliche Zellorganellen, von denen der Zellkern als am empfindlichsten gegenüber ionisierender Strahlung angesehen wird [40]. Dieser enthält die Desoxyribonukleinsäure (engl. *desoxyribonucleic acid*, DNA), welche die Erbinformation der Zelle trägt (Kap. 2.2.1). Die Erbinformation wird überwiegend als Vorlagen zur Synthese von Proteinen benutzt. Proteine bilden die molekulare Maschinerie der Zelle und bestehen aus Aminosäureketten. Der Schlüsselaspekt, der die Zelle zur kleinsten biologischen Untereinheit macht, ist ihre Fähigkeit, sich in zwei identische Tochterzellen zu teilen, welche sich wiederum teilen und differenzieren können.

Der Lebenszyklus einer Zelle wird als Zellzyklus bezeichnet. Dieser beginnt mit der ersten *gap*-Phase (G1-Phase), in der sich Zellen hauptsächlich auf die Synthese-Phase (S-Phase) vorbereiten. Während der S-Phase wird eine exakte Kopie der DNA angefertigt (Kap. 2.2.1). In der *gap*-Phase (G2-Phase) bereiten die Zellen sich auf die Mitose (M-Phase) vor. Als Abgrenzung zur Mitose werden die G1-, S- und G2-Phase zur Interphase zusammengefasst. In der M-Phase teilt sich die sogenannte Mutterzelle in zwei Tochterzellen. Die zwei Tochterzellen werden als neue Zellen angesehen, deren Zellzyklus wieder mit der G1-Phase beginnt. Die typische Dauer des Zellzyklus von Säugerzellen beträgt 12 bis 24 Stunden [41]. Zellen können auch in eine Ruhe-Phase (G0-Phase) treten, in der sie stationär in einem G1-Phasen ähnlichem Zustand verbleiben. In bestimmten Fällen können diese Zellen aber auch wieder in den Zellzyklus übergehen. Gutartige Zellen gehen in G0-Phase über, wenn diese von anderen Zellen umringt sind, was als Kontaktinhibition bezeichnet wird. Werden die Nachbarzellen entfernt, so können die verbleibenden Zellen wieder in die G1-Phase eintreten. Zellen können im Zellzyklus arretiert werden, falls diese Schaden erleiden. Der Zweck des Zellzyklusarrest ist, Schäden reparieren zu können, bevor zur nächsten Phase fortgeschritten wird. Die Regulation des Fortschritts im Zellzyklus wird über sogenannte *cell cycle checkpoints* realisiert [42].

Organisation der DNA

Bei der DNA handelt es sich chemisch gesehen um ein Polymer, dessen Untereinheiten als Nukleotide bezeichnet werden. Nukleotide setzen sich aus dem Zucker Desoxyribose, einem Phosphatrest und einer Nukleinbase zusammen. Die Phosphat- und Desoxyribose-Moleküle bilden einen sich wiederholenden Strang. Die Nukleinbasen sind jeweils mit der Desoxyribose verbunden. Die Nukleotide unterscheiden sich durch die enthaltene Base. Die vier Arten der Basen sind: Adenin (A), Thymin (T), Guanin (G) und Cytosin (C). Die DNA liegt im Normalfall in einer Doppelhelix vor, bei der die gegenüberliegenden Stränge von Wasserstoffbrücken zwischen den Nukleinbasen zusammengehalten werden. Dabei stehen sich immer jeweils A-T und C-G gegenüber. Die Reihenfolge der Nukleinsäure beinhaltet die genetische Information. Ein Gen bezeichnet eine DNA-Sequenz, welche mithilfe mehrerer Syntheseprozesse zu ei-

nem Protein exprimiert werden kann. Dieser Vorgang wird Genexpression genannt und lässt sich in zwei Schritte unterteilen: zuerst werden Gene mithilfe von Enzymen in *messenger*-Ribonukleinsäure (mRNA) kopiert (Transkription). Im zweiten Schritt, der Translation, wird aus der mRNA eine Aminosäuresequenz synthetisiert, welche dann zu einem funktionalen Protein gefaltet wird. Hierbei stellen Aminosäuren die Grundsteine der Proteine dar. Zu den Aufgaben der Proteine gehören unter anderem, die Genexpression zu regulieren und DNA-Schäden zu reparieren.

Die Funktion der nicht-kodierenden Bereiche der DNA ist noch nicht gänzlich geklärt. Eine der bekannten Funktionen ist z. B. die Regulation der Genexpression; dadurch können diese ebenso essenziell für das Zellüberleben wie die kodierenden Bereiche der DNA sein.

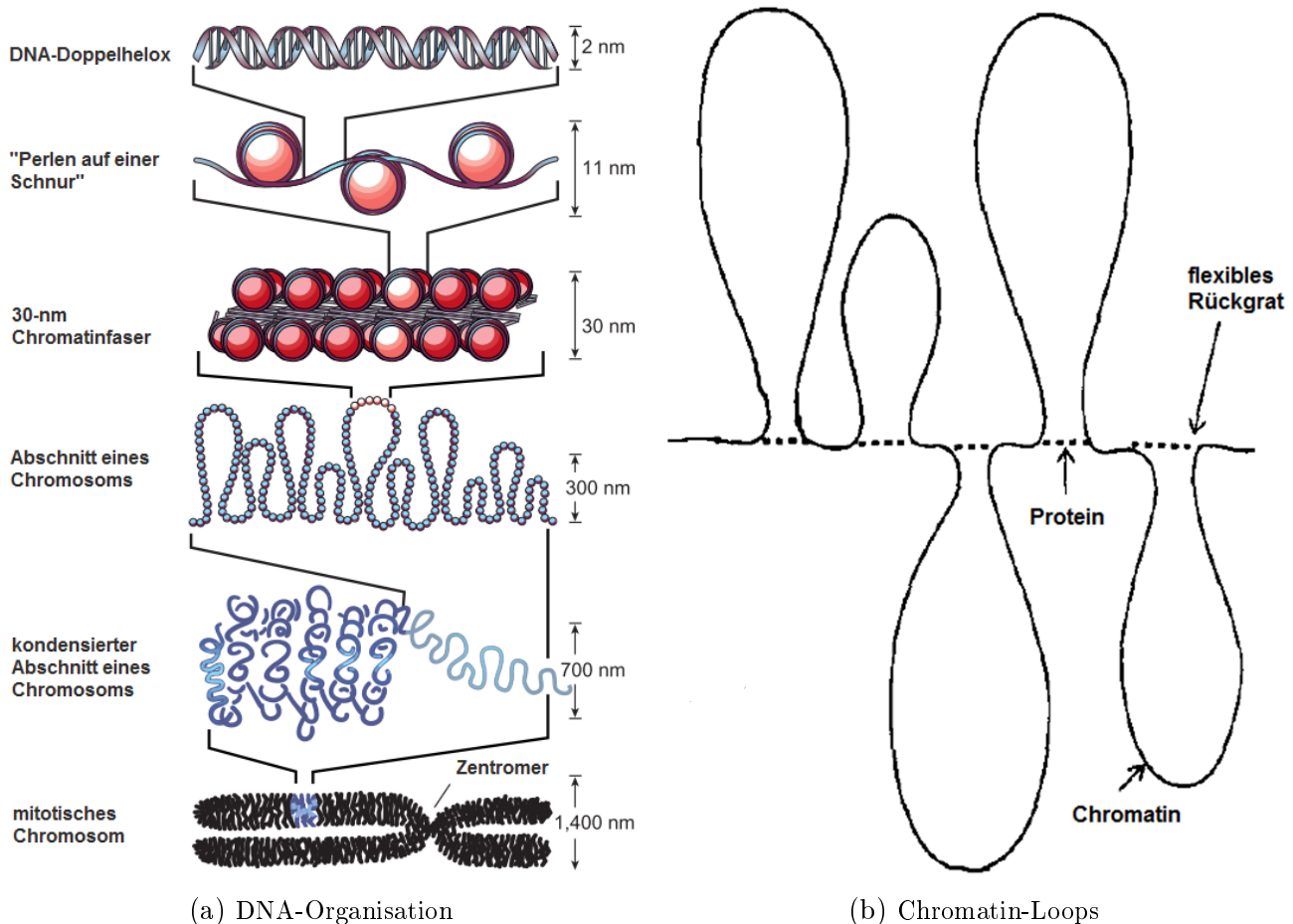


Abbildung 3: Darstellungen der unterschiedlichen DNA-Organisationsebenen bzw. Verdichtungsstufen. Abbildung a zeigt eine Übersicht der unterschiedlichen Organisationsebenen, von Doppelhelix bis zu den Chromosomen (angepasst aus Ref. [43]). Abbildung b zeigt die vermutete Organisationsebenen der Chromatin-Loops auf einer Längenskala von 540 nm, ≈ 2 Mbp; die einzelnen Elemente sind jeweils an der Kernmatrix befestigt (angepasst aus Ref. [44]).

Das typische Genom (Gesamtheit der Träger von Erbinformationen) eines Säugers enthält ca. $6 \cdot 10^9$ bp bei einer Gesamtlänge der DNA-Moleküle von zwei Metern. Damit das Genom in den Zellkern passt, muss es auf einige μm -Länge verpackt werden. Zu diesem Zweck wird die DNA um Histone gewickelt. Eine Einheit davon wird als Nukleosom bezeichnet. Zwischen den Nukleosomen befindet sich Linker-DNA, woraus sich ein Nukleosom-Array in der Form von Perlen auf einer Schnur ergibt. Diese DNA-Verdichtungsstufe hat einen Durchmesser von 11 nm. Es wird angenommen, dass die nächsthöhere

Verdichtungsstufe die Chromatinfaser mit einem Durchmesser von 30 nm ist. Die weiteren Verdichtungsstufen sind bisher nicht vollständig aufgedeckt. Die höchste Verdichtungsstufe liegt vor, wenn die DNA während der Mitose zu Chromosomen verpackt vorliegt. Eine schematische Darstellung der verschiedenen Verdichtungsstufen ist in Abbildung 3a aufgeführt. Obwohl die Organisation der DNA zwischen der Organisationsstufe der Chromatinfaser und den Chromosomen noch nicht gänzlich geklärt ist, gibt es Hinweise darauf, dass die so genannten Chromatin-Loops (Abb. 3b) eine wichtige Rolle für die Integrität des Genoms spielen [44]–[47]. Es wird erwartet, dass die Chromatin-Loops etwa 2 Mbp enthalten [3].

Während der Interphase liegen Teile der DNA locker verpackt vor. Diese werden als Euchromatin bezeichnet. Dichter verpackte DNA wird als Heterochromatin benannt. Bei Heterochromatin wird zwischen konstitutivem Heterochromatin, welches in allen Zellen als Heterochromatin vorliegt, und fakultativem Heterochromatin, das nur in einigen Zellen als Heterochromatin vorliegt, unterschieden. Kodierende Bereiche der DNA, die translatiert werden, liegen meist als Euchromatin vor, während die inaktiven Bereiche eher als Heterochromatin verpackt werden.

DNA-Replikation

Eine stark vereinfachte Beschreibung der DNA-Replikation während der S-Phase ist, dass die Doppelhelix enzymatisch katalysiert in zwei einzelnen Strängen aufgetrennt wird. Zu diesen werden anschließend komplementäre Stränge synthetisiert, sodass am Ende des Prozesses die DNA in doppelter Ausführung vorliegt. Jede Tochterzelle bekommt während der Zellteilung je eine Kopie der DNA. Aufgrund der Größe und Komplexität der DNA sowie der Wichtigkeit einer korrekten Replikation, ist die Replikation ein hoch komplexer und stark regulierter Prozess. Aktive DNA-Replikationsstellen werden als Replikons bezeichnet. Davon sind während der Replikation ca. tausend gleichzeitig aktiv. Untersuchungen der Replikationskinetik zeigen, dass die Replikation zunächst an wenigen Orten beginnt und anschließend an sehr vielen gleichzeitig stattfindet [48], [49]. Die Anzahl der replizierten Basenpaare pro Zeiteinheit hat eine feste Obergrenze. Dadurch wird die DNA, nach einer anfänglichen Beschleunigung, mit einer konstanten Geschwindigkeit repliziert, die gegen Ende der S-Phase wieder abfällt. Die Stellen, an denen die Replikation startet, sind zum Teil zufällig und zum Teil durch die Replikation an einem benachbarten DNA-Abschnitt induziert [49]. Bereiche der DNA, welche die Eigenschaften euchromatisch, kodierend und stark exprimiert aufweisen, haben eine höhere Wahrscheinlichkeit für eine spontane Initiation der Replikation und werden damit eher in der frühen S-Phase repliziert [50]–[53]. Die Replikation in heterochromatischen, nichtkodierenden und schwach exprimierten Bereichen der DNA wird eher durch benachbarte Replikons induziert und finden damit in der Mitte bis Ende der S-Phase statt. Damit ist die zeitliche Abfolge der Replikation wie folgt: Euchromatin, fakultatives Heterochromatin und zuletzt konstitutives Heterochromatin. Da die Initiation der einzelnen Replikons ein statistischer Prozess ist, sind die Übergänge fließend und überlappend. Eine Untersuchung der Replikationskinetik zeigt, dass bis zur Mitte der S-Phase das Euchromatin weitgehend repliziert ist [49].

2.2.2 Strahleninduzierte zelluläre Effekte und DNA-Schäden

Die strahleninduzierten Ionisationen biologisch aktiver Moleküle führen zu deren Schädigung, welche zu Fehlfunktionen auf zellulärer oder höherer Ebene führen können. Das Spektrum der durch Strahlung

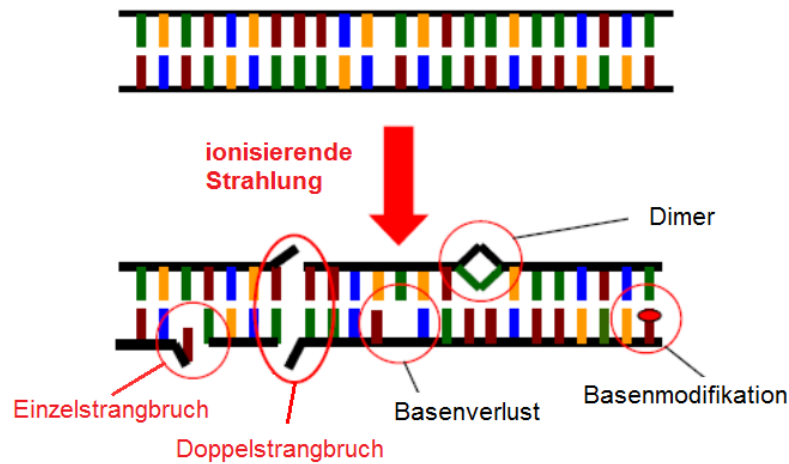
induzierten Schäden ist sehr breit und betrifft alle Bestandteile einer Zelle. Als kritisches Ziel wird typischerweise die DNA angesehen, da davon nur eine Kopie vorhanden ist und als Grundlage für alle anderen Bestandteile gilt. Ist die genetische Information einmal verloren, gibt es keine Möglichkeit diese wiederherzustellen. Andere Komponenten der Zelle liegen hingegen in mehrfacher Ausführung vor und werden ohnehin kontinuierlich produziert [40]. Ionisierende Strahlung kann zu Strangbrüchen, Verlust oder Modifikation von Basen oder Bildung von Dimeren und weiteren Veränderungen (siehe Abb. 4a) führen. Als schwerwiegendster DNA-Schaden wird der Doppelstrangbruch (DSB) angesehen [54], [55], da dies eine vollständigen Trennung der DNA-Doppelhelix bedeutet. Bei den anderen Schadensarten bleibt die Struktur der DNA erhalten. Vereinzelte DSB sind in Zellen nicht selten und können meistens gut repariert werden. Das Aufeinandertreffen mehrerer DNA-Schäden in räumlicher Nähe führt zur Entstehung von DNA-Fragmenten. Das richtige Zusammenfügen mehrerer DNA-Fragmente ist nicht mehr trivial, wodurch diese Schäden ernster als einzelne DSB sind. Das Aufeinandertreffen von DNA-Schäden wird als DNA-Schadensclustering bezeichnet. Eine DNA-Schadensclustering, welche zusammengefasst einen schwereren Schaden darstellen als die einzelnen Schäden, wird Interaktion von Schäden genannt. Es gibt unterschiedliche Hypothesen, auf welcher Längenskala die biologisch relevante Interaktion von Schäden stattfindet. Die Größenordnungen reichen dabei von der nm-Skala [18], [19], [22], [23], [25], [35], [36] bis zur μm -Skala [3], [4], [11]–[15]. Mit der DNA-Schadensinteraktion auf der nm-Skala sind multiple Strangbrüche im Abstand einiger Basenpaare gemeint. Diese können nach Komplexität klassifiziert werden, wie in Abbildung 4b nach den Arbeiten von Nikjoo et al. [25], [35], [36] beispielhaft dargestellt ist. Dabei werden DNA-Segmente von 54 bp ($\approx 16\text{ nm}$) betrachtet [56]. Ein Beispiel für die Schadensclustering auf der μm -Skala ($0.54\text{ }\mu\text{m}$) ist in Abbildung 4c dargestellt. Dabei handelt es sich die Größenordnung der Chromatin-Loops, welche durch das GLOBLE-Modell und LEM berücksichtigt wird. Die Schadensklassen selbst werden später, im Zusammenhang der radiobiologischen Modelle, genauer erörtert.

2.2.3 DNA-Reparaturwege

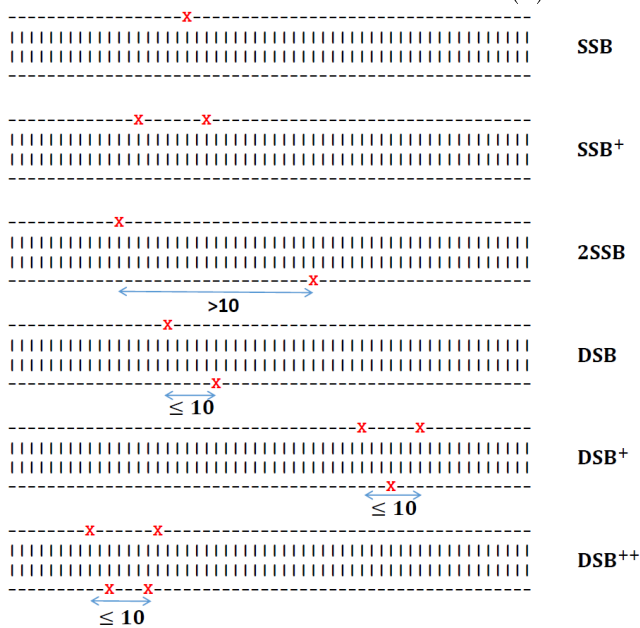
Säugerzellen verfügen über spezialisierte Reparaturwege für die verschiedene Arten der DNA-Schäden. Zur Modellierung des Zellüberlebens spielen DSB die wichtigste Rolle. Deshalb werden nur diese in der vorliegenden Arbeit näher beleuchtet. Die zwei häufigsten und am meisten untersuchten DSB-Reparaturwege sind *Non Homologous End Joining* (NHEJ) und *Homologous Recombination* (HR). Zu diesen zwei Reparaturwegen existieren alternative Reparaturwege die eine sehr hohe Fehlerquote aufweisen. Bei der Modellierung des Zellüberlebens ist die Fidelität der Reparaturwege relevant, da eine Fehlreparatur von DSB zu schwerwiegenden genetischen Schädigungen führen kann [58].

Non Homologous End Joining

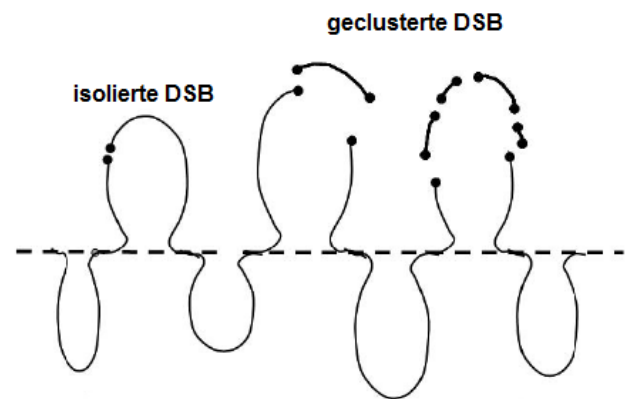
Der Reparaturweg NHEJ stellt die einfachste Form der DSB-Reparatur dar, in dem beide offenen DNA-Enden verknüpft werden [59]. Dieser Reparaturweg steht während des ganzen Zellzyklus zur Verfügung [60]. Die Prozedur kann in vier Schritte unterteilt werden. Als erstes bindet der Ku70/80 Heterodimer an das offene DNA-Ende. Dieser Komplex rekrutiert und aktiviert die dazugehörige katalytische Untereinheit (DNA-PKCS). Im zweiten Schritt werden die DNA-Enden bearbeitet, um Überstände zu entfernen. Im dritten Schritt werden fehlende Basen der Doppelhelix aufgefüllt. Im vierten Schritt werden die DNA-Enden durch die Ligase 4 verknüpft.



(a) DNA-Schadensarten



(b) DNA-Schadenscluster auf der nm-Skala



(c) DSB Cluster der μ m-Skala

Abbildung 4: Abbildung a zeigt eine Auswahl typischer DNA-Schäden die durch ionisierende Strahlung hervorgerufen werden (angepasst aus Ref. [30]). Abbildung b zeigt die Clusterung von SSB und DSB auf der nm-Skala [56] (Abb. angelehnt an die in Ref. [57]). Die Striche stellen in der Skizze das Zucker-Phosphat-Rückgrat der DNA dar, die Punkte die Basen und x stehen für Strangbrüche. Abbildung c zeigt DSB-Cluster auf der μ m-Skala, wie diese im GLOBLE-Modell und LEM verwendet werden (angepasst aus Ref. [3]).

Homologe Rekombination

Der Reparaturweg HR repariert DSB, indem die beschädigte Sequenz von dem Schwesterchromatid kopiert wird. Das Schwesterchromatid bezeichnet die identische Kopie des DNA-Abschnitts, welche während der S-Phase synthetisiert wird. Dadurch wird dieser Reparaturweg als fehlerfrei angesehen. Das Vorhandensein eines Schwesterchromatids ist jedoch erforderlich, wodurch die HR nur in der S- und G2-Phase zur Verfügung stehen kann [61]. Der Reparaturweg wird durch eine Resektion der DNA an der Bruchstelle eingeleitet. Nach der Resektion lagern sich Proteine am DNA-Strang an, um ihn zu stabilisieren. Das so formierte Nukleoproteinfilament dringt in das Schwesterchromatid ein und bildet den

sogenannten D-Loop. Anschließend wird die DNA über die Bruchstelle hinaus synthetisiert, um die fehlende genetische Information aufzufüllen. Danach wird der DNA-Strang wieder freigegeben. Dabei spielt das Protein Rad54 eine Rolle [62]. Der freigegebene Strang lagert sich hinter der Bruchstelle an den anderen Strang an. Danach werden fehlende Basen aufgefüllt und überstehende Stränge entfernt. Schließlich werden die offenen Verbindungen des DNA-Zuckerphosphatrückgrats verknüpft.

2.2.4 Zellüberleben

Im Rahmen dieser Arbeit wird die klonogene Zellüberlebenswahrscheinlichkeit, auch als (Zell-)Überleben oder Koloniebildungsfähigkeit bezeichnet, untersucht. Das Zellüberleben gibt die Wahrscheinlichkeit an, dass eine einzelne Zelle innerhalb von ein bis zwei Wochen eine Kolonie mit mindestens 50 Zellen ausbildet [63]. Diese Definition gilt für alle in dieser Arbeit aufgeführten Ergebnisse. Der Zusammenhang zwischen der Dosis und dem Zellüberleben wird auch als (Zell-)Überlebenskurve bezeichnet. Der Ausdruck Effekt bezieht sich hierbei meistens auf den negativen natürlichen Logarithmus des Zellüberlebens. Es ist zu beachten, dass ebenfalls andere Definitionen des Zellüberlebens existieren, die z. B. die Teilungsfähigkeit außer Acht lassen und sich auf den Metabolismus von Zellen beziehen.

Das Zellüberleben wird experimentell in Zellkulturen bestimmt. Dabei werden normalerweise Zelllinien verwendet. Das sind Zellen, die ursprünglich aus Normal- oder Tumorgewebe entnommen wurden, jedoch einige der normalen Eigenschaften (aufgrund von Mutationen oder gentechnischen Modifikationen) nicht mehr aufweisen. Dies kann z. B. in einer fehlenden Differenzierung oder unendlichen Teilungskapazität resultieren. Damit spiegeln Zelllinien also nicht den natürlichen Zustand eines somatischen Gewebes wieder und können je nach Zelllinie weitere Abweichungen aufweisen. Allerdings eignen sich Zelllinien als Modellorganismen, da sie sich gut charakterisieren lassen und mit ihnen durchgeführte Experimente zu reproduzierbaren Ergebnissen führen. Bei dem Transfer der Ergebnisse zu Normal- oder Tumorgewebe muss die allerdings Auswirkung der speziellen Eigenschaften der verwendeten Zelllinien bedacht werden. Dies geschieht oft, indem Experimente mit unterschiedlichen Zelllinien wiederholt werden. Darüber lässt sich bestimmen, welche der Eigenschaften zelllinienabhängig und welche -unabhängig sind.

Einfluss des Zellzyklus

Während der S-Phase haben Zellen eine hohe Resistenz gegenüber Photonenstrahlung. Gegenüber hoch-LET-Strahlung sind Zellen während der S-Phase jedoch empfindlich. Dies ist am Beispiel von der Hamsterfibroblasten-Zelllinie V79 nach 5 Gy Photonenstrahlung und 53 Gy Uranionenbestrahlung in Abbildung 5 aufgeführt. Die Dosen wurden so gewählt, dass sie zum gleichen mittleren Effekt führen. Die Dosis der Uranbestrahlung ist viel höher, da Uranionen aufgrund ihres hohen LET zu einer reduzierten RBE führen.

Daraus lässt sich ableiten, dass das Zellüberleben von gegenläufigen Effekten abhängt, deren Ausprägung von der Strahlenqualität abhängig ist. Während der S-Phase wird der fehlerfreie Reparaturweg HR verfügbar, was zu einer Erhöhung der Resistenz gegenüber Photonenstrahlung führt. Schwerionenbestrahlung induziert allerdings komplexere DNA-Schäden als Photonenbestrahlung. Ebenfalls vergrößert sich der Zellkern während der S-Phase, wodurch dessen Wahrscheinlichkeit von Ionen getroffen zu werden vergrößert.

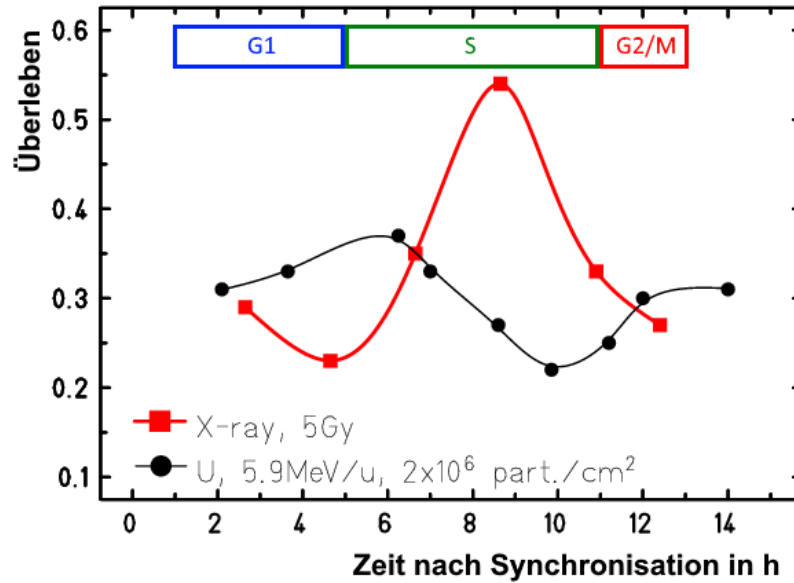


Abbildung 5: Zellzyklusspezifisches Überleben von V79 Zellen nach Bestrahlung mit 5 Gy Photonenstrahlung bzw. 53 Gy Uranionen ($2 \cdot 10^6$ Teilchen/cm²) zu verschiedenen Zeiten nach Synchronisation. Die mit Photonen bestrahlten Zellen zeigen die charakteristische Resistenz während der S-Phase, die mit Uranionen bestrahlten Zellen sind während der S-Phase sensitiver (angepasst aus Ref. [64]).

2.3 Radiobiologische Modelle

Zur Beschreibung des Zellüberlebens nach Bestrahlung mit Photonen- oder Ionenstrahlung existieren verschiedene Modelle, die unterschiedliche Ansätze zur Beschreibung der Strahlenwirkung verfolgen. Im Folgenden werden die gängigen Modelle vorgestellt.

Am einfachsten lässt sich das Zellüberleben nach Photonenbestrahlung empirisch durch das LQ-Modell beschreiben. Bei einer semilogarithmischen Darstellung, in Abhängigkeit der Dosis, zeigt das Zellüberleben die Form eines Polynoms zweiter Ordnung. Daher ist die einfachste Darstellung des Überlebens das LQ-Modell, bei dem das Überleben S durch

$$S(D) = \exp[-(\alpha D + \beta D^2)] \quad (5)$$

mit der Dosis D , dem linearen Parameter α und dem quadratischen Parameter β , berechnet wird. Diese Parameter sind zelllinien- bzw. gewebespezifisch und werden im Folgenden als LQ-Parameter bezeichnet. Das LQ-Modell stellt eine angemessene Beschreibung des Zellüberlebens bis etwa 10 Gy dar. Für mechanistische Beschreibungen des Zellüberlebens gibt es im Wesentlichen zwei Ansatzpunkte: die Interaktion von Schäden und die Reparatur von Schäden. Diese Ansatzpunkte können unabhängig voneinander oder auch kombiniert verfolgt werden. Ein Beispiel für Interaktionsmodelle ist das Target-Modell [65], bei dem angenommen wird, dass Zellen aus mehreren Targets ($\approx 1-3$) bestehen. Sobald eine gewisse Energie innerhalb aller Targets deponiert wurde, führt dies zum Zelltod. Dieses Modell zeigt jedoch Diskrepanzen mit experimentellen Daten; unter anderem kann die Steigung der Überlebenskurven bei niedrigen Dosen nicht erklärt werden [30]. Ein Beispiel für Reparaturmodelle ist das *Repair-MisRepair Modell* (RMR-Modell) [66]. Das RMR-Modell betrachtet die zeitliche Entwicklung, bzw. die Transfor-

mation, initialer Schäden. Dabei wird untersucht, welcher Anteil der Schäden korrekt bzw. fehlerhaft repariert wird.

Das *Microdosimetric-Kinetic Model* (MKM) [67] wurde als Erweiterung des RMR-Modells [66] und des *Lethal and Potentially Lethal Model* (LPL-Modell) [68] entwickelt. Das MKM verfolgt sowohl den Ansatz der Interaktion als auch den der Reparatur von Schäden. Dabei werden letale (Typ I) und subletale Schäden (Typ II) auf DNA-Domänen der Größe 1 Mbp proportional zur deponierten spezifischen Energie induziert. Anschließend werden Reparaturkinetiken über Differentialgleichungen dargestellt, welche die Reparatur von Typ II Schäden, Umwandlung von Typ II Schäden zu Typ I und die Bildung von Typ I Schäden durch die Interaktion von Typ II Schäden beschreiben. Die direkte Induktion von Typ I Schäden und Typ II Schäden, die sich in Typ I umwandeln, tragen zum linearen Term der Überlebenskurve bei. Der quadratische Term wird mit der Interaktion von Typ II Schäden assoziiert. Es wird vermutet, dass es sich bei Typ II Schäden um DSB handelt. Typ I Schäden werden nicht genauer spezifiziert. Über die empirische Beschreibung von Reparaturkinetiken der Typ II Schäden kann das MKM Dosiseffektkurven mit zeitlich ausgedehnter Bestrahlung, Zeit-Dosis-Effekte genannt, beschreiben.

Das Biophysical ANalysis of Cell death and chromosome Aberrations (BIANCA)-Modell [69], [70] sagt das Zellüberleben aufgrund der Induktion von chromosomalen Aberration vorher. Dabei wird die Induktionsrate von *cluster lesions*, einem DNA-Schaden der zu zwei unabhängigen freien chromosomalen Enden führt, und die Interaktionsreichweite der *cluster lesions* an Daten angepasst. Zur Beschreibung von Zellüberlebenskurven nach Ionenbestrahlung wird die Induktionsrate der *cluster lesions* neu angepasst, während die Interaktionsreichweite derselben Zelllinie aus Experimenten mit Photonenstrahlung verwendet wird.

McMahon et al. [71] stellen ein Modell vor, das DSB-Induktion, DSB-Reparaturwegwahl, Reparaturweggüte, Reparaturkinetiken, chromosomale Aberrationen und Zellüberleben in einem gemeinsamen Gleichungssystem mit einander in Verbindung setzt. Durch elf freie Modellparameter, zwei zelllinienspezifische und neun zelllinienunabhängige, können DSB-Reparaturkinetiken, Fehlreparaturrate, chromosomale Aberrationen, Mutationsraten und Zellüberleben für Zellen in G1- oder G2-Phase miteinander in Verbindung gebracht werden. Die einzelnen Endpunkte werden über empirische Befunde oder heuristische Annahmen miteinander verknüpft.

Das GLOBLE-Modell [3] betrachtet die Interaktion von DSB auf der Größenordnung von 2 Mbp, den Chromatin-Loops. Ein DSB pro Chromatin-Loop wird als iDSB und zwei DSB pro Chromatin-Loop werden als cDSB bezeichnet. Den zwei Schadensklassen werden Letalitäten zugewiesen, welche eine Wahrscheinlichkeit angeben, mit der diese Schäden zum Zelltod führen. Die Arbeit von Lisa Herr [72] konnte zeigen, dass über eine kinetische Erweiterung die Reparatur von DNA-Schäden berücksichtigt werden kann. Dadurch lassen sich Zeit-Dosis-Effekte durch das GLOBLE-Modell, ähnlich zu den oben vorgestellten Modellen, beschrieben. Das zellzyklusspezifische GLOBLE-Modell betrachtet die Verfügbarkeit der Reparaturwege NHEJ und HR während des Zellzyklus sowie deren Fidelität [4]. Damit lässt sich das Zellüberleben synchroner Zellen an unterschiedlichen Positionen im Zellzyklus und der Einfluss von Defiziten einzelner Reparaturwege vorhersagen.

Der typische Anwendungsbereich der radiobiologischen Modelle überdeckt Dosen von 0 bis ca. 10 Gy, im Kontext dieser Arbeit wird dies auch als Niedrigdosisbereich bezeichnet. Für höhere Dosen werden Abweichungen von der reinen LQ-Form der Überlebenskurven beobachtet. Oberhalb eines Übergangsbe-

reichs weisen Überlebenskurven kleinere quadratischen Anteile auf, bis hin zu einer rein linearen Form [5]–[10]. Der Übergangsbereich wird im LQL-Modell durch eine konkrete Übergangsdosis angenähert. Es ist in Bezug auf andere Modelle zu beachten, dass es sich bei dem Begriff Übergangsdosis um keine einheitliche Definition handelt. Bei den Beschreibungen in den Refs. [5]–[7] wird auf diese kein direkter Bezug genommen, sie lässt sich aber aus den Formen der Überlebenskurven erahnen. Deshalb wird der Begriff der Übergangsdosis in abstrakter Form auch als Grenze zwischen zwei Bereichen von Überlebenskurven bezeichnet. Die Dosis bei der dieser Übergang eintritt ist zelllinienabhängig. Diese Abweichung der Überlebenskurven von der LQ-Form stellt unter anderem ein Problem für die Vorhersagen der Strahlungseffekt nach hohen Dosen dar, da diese oft über das LQ-Modell aus dem Niedrigdosisbereich extrapoliert werden. Entsprechend wird das LQ-Modell als Näherung für den Niedrigdosisbereich angesehen [73]. Einige Arbeiten [5]–[7] schreiben die Abweichung von der LQ-Form den heterogenen Radiosensitivitäten von Zellen in verschiedenen Zellzyklusphasen zu. Die Form der Überlebenskurven kann durch das LQL-Modell angenähert werden, d. h. bis zu einer Übergangsdosis haben die Überlebenskurven eine LQ- und oberhalb dieser Dosis eine rein lineare Form [8]–[10]. Für Anwendungen mit dem LEM wurde ein Zusammenhang zwischen den Parametern des LQ-Modells und der Übergangsdosis gezeigt [74], der mechanistische Zusammenhang konnte jedoch bisher nicht geklärt werden.

Da für Photonenstrahlung eine homogene Dosisdeposition über die ganze Zelle angenommen wird, muss ein Modell zur Vorhersage des Überlebens nur die physikalische Dosis berücksichtigen². Für Ionenstrahlung muss zusätzlich noch die räumliche Verteilung der Dosis berücksichtigt werden, welche innerhalb von Zellkernen stark inhomogen sein kann. Die physikalischen Wechselwirkungen in Kapitel 2.1 beschreiben elementare Wechselwirkungen von Ionen mit infinitesimal dünnen Materieschichten. Zur Beschreibung der gesamten Ionenspur werden *track-structure codes* eingesetzt. Die dafür verwendeten Methoden reichen von simplen eindimensionalen Parametrisierungen bis zu anspruchsvollen vierdimensionalen Monte-Carlo-Simulationen [29]. Im Zusammenhang mit der Radiotherapie werden meistens amorphe Bahnstruktur-Modelle [11], [76] oder *ab initio* Monte-Carlo-Simulationen einzelner Ionisationen betrachtet [22], [23], [25]–[28]. Diese Modelle finden ebenfalls in der Behandlungsplanung und im Strahlenschutz Anwendung. Die Beschreibung durch die amorphe Bahnstruktur parametrisiert die mittlere radiale Dosisdeposition transversal zur Ionenflugrichtung unter Vernachlässigung aller stochastischer Fluktuationen der deponierten spezifischen Energie. Bei den *ab initio* Simulationen werden vierdimensionalen Monte-Carlo-Simulationen durchgeführt. Dabei wird zuerst die dreidimensionale räumliche Verteilung einzelner Ionisationen simuliert. Die vierte Dimension bezieht sich auf die zeitliche Entwicklung der Ionenspur. Das beinhaltet unter anderem die Bildung und Diffusion der ROS. Für die *ab initio* Simulationen müssen sehr viele Effekte elementarer Wechselwirkungen bedacht werden, die Wirkungsquerschnitte von Wasser und DNA, die Bildung von Sekundärelektronen und deren Transport sowie Bildung von ROS und deren Diffusion. Es wird erwartet, dass der hohe Genauigkeitsgrad der *ab initio* Simulationen präzisere radiobiologische Vorhersagen ermöglicht als die vereinfachte Methode der amorphen Bahnstruktur [77]. Viele Eigenschaften der einzelnen Prozesse sind jedoch experimentell nicht gemessen worden, sondern werden über theoretische oder heuristische Herleitungen beschrieben. Demzufolge sind die einzelnen simulierten Wirkungsquerschnitte eher als Schätzwerte zu interpretieren [29]. Außerdem sind *ab initio* Monte-Carlo-Simulationen mit hohen Rechenzeiten verbunden. Demnach ist ein

² Es gibt Hinweise für eine Abhängigkeit der RBE von der Energie der Photonenstrahlung [75], dies spielt im Kontext dieser Arbeit jedoch keine weitere Rolle.

Argument für die amorphe Bahnstruktur die Einfachheit der Beschreibung der deponierten Dosis, welche mit wenig Rechenzeit ausgewertet werden kann. Des Weiteren sind die Mechanismen zwischen den initialen molekularen Schäden und den möglichen biologischen Endpunkten nicht gänzlich geklärt. Das hat zur Folge, dass eine genauere Beschreibung der physikalischen Strahlenwirkung, auf dem aktuellen Wissensstand, zu keiner genaueren Beschreibung der biologischen Strahlenwirkung führt.

Das typische Vorgehen bei der Beschreibung der Strahlenwirkung ist, dass im ersten Schritt die physikalische Dosisdeposition beschrieben und in einem zweiten Schritt der spezifischen deponierten Energie ein biologischer Effekt zugewiesen wird. Das *ion kill-gamma kill* (IGK) Modell [76], [77] beschreibt die physikalische Dosis über die amorphe Bahnstruktur. Der Effekt der Ionenstrahlung wird schließlich aus der Dosiseffektkurve nach Photonenstrahlung bestimmt. Die Dosiseffektkurve nach Photonenbestrahlung wird dabei durch das Target-Modell beschrieben. Ähnlich dazu wurde das LEM [11]–[15] entwickelt. Mithilfe der amorphen Bahnstruktur wird ebenfalls das Zellüberleben nach Ionenbestrahlung aus dem Zellüberleben nach Photonenbestrahlung vorhergesagt. Die Dosiseffektkurve nach Photonenbestrahlung wird jedoch durch das LQL-Modell beschrieben. In der aktuellen vierten Version des LEM [14], [15] wird die DSB-Verteilung auf der Chromatin-Loops Struktur aus der deponierten Dosis bestimmt und aus der Schadensverteilung wird das Zellüberleben vorhergesagt. Das Zellüberleben nach Ionenbestrahlung kann ebenfalls durch das MKM vorhergesagt werden. Dafür wird unter Zuhilfenahme einer Parametrisierung der spezifischen deponierten Energie die Induktion der Typ I und Typ II Schäden ausgewertet.

Das Bestreben hinter den *ab initio* Modellen PARTRAC [26], [28], [78] KURBUC [25], [35], [36], [57] Geant4-DNA [27], [79], [80] und *MultiScale Approach* (MSA) [22], [23] ist es, eine rein mechanistische Beschreibung der Strahlenwirkung, unter Berücksichtigung aller beitragender Effekte, zu liefern. Dafür werden mit Monte-Carlo-Methoden vierdimensionale Ionenspuren simuliert, aus denen strahlenbedingte molekulare Schäden der DNA bestimmt werden können. Es gibt Bestrebungen das Zellüberleben basierend auf den mit KURBUC simulierten Ionenspuren vorherzusagen, was mit dem aktuellen Entwicklungsstand des Modells jedoch noch nicht möglich ist [57]. Die aktuelle Stand ist, dass zusätzlich zu den molekularen DNA-Schäden Modelle bezüglich der DNA-Reparatur durch NHEJ und HR verwendet werden, welche einzelne Moleküle der DNA-Reparatur berücksichtigen. Damit können bisher DSB-Reparaturkinetiken nach Bestrahlung mit verschiedenen Ionen wiedergegeben werden. PARTRAC benutzt ebenfalls ein Modell zur DNA-Reparatur durch NHEJ auf molekularer Ebene [78]. Damit können korrekte Reparaturen, Fehlreparaturen und chromosomale Aberrationen vorhergesagt werden. MSA wertet die molekularen Schäden nach Bestrahlung aus und verknüpft einen bestimmte Schadenscluster auf der nm-Skala direkt mit dem Zelltod. Bei Geant4-DNA handelt es sich um ein Monte-Carlo-Modell, welches physikalische elektromagnetische Wechselwirkungen ionisierender Strahlung auf der Ebene von DNA-Schäden modelliert und ist damit mit den zuvor genannten *ab initio* Modellen vergleichbar.

Im Folgenden werden die radiobiologischen Modelle genauer vorgestellt, die in dieser Arbeit analysiert werden. Das LQ- und LQL-Modell werden als Näherung des Zellüberlebens nach Photonenbestrahlung benutzt. Zur Vorhersage des Überlebens synchroner Zellen nach Photonenstrahlung wird das GLOBLE-Modell und nach Ionenstrahlung das LEM benutzt. Als Beispiel einer *ab initio* Simulation zur Dosisdeposition von Ionen wird KURBUC [36] verwendet.

2.3.1 Das linearquadratisch-lineare Modell

Das LQL-Modell wird genutzt, um den Übergang von Zellüberlebenskurven nach hohen Dosen Photonenbestrahlung in eine lineare Form zu parametrisieren [11]. Das Überleben wird aus

$$S = \begin{cases} \exp[-(\alpha D + \beta D^2)] & D < D_t \\ \exp[-(\alpha D_t + \beta D_t^2 + s_{max}(D - D_t))] & D \geq D_t \end{cases} \quad (6)$$

mit den α, β Parametern des LQ-Modells, der Übergangsdosis D_t und der maximalen Steigung s_{max} vorhergesagt. Innerhalb des LQL-Modells ist die maximale Steigung s_{max} die Steigung der LQ-Kurve an der Übergangsdosis D_t und somit durch

$$s_{max} = \alpha + 2\beta D_t \quad (7)$$

gegeben. Dies ist nach Ref. [8] in den meisten Fällen eine gute Näherung. Die D_t selbst ist schwierig alleine aus Überlebenskurven zu bestimmen. In Zusammenhang mit dem LEM [14], [15] gibt es eine empirische Abschätzung der D_t aus dem Quotienten der LQ-Parametern α/β [74]:

$$D_t = 4 \text{ Gy} + 1.1 \cdot \alpha/\beta. \quad (8)$$

Das LQ-Modell kann eingesetzt werden, um das Überleben nach Photonen und Ionenbestrahlung zu beschreiben. Zur Charakterisierung der Form von Überlebenskurven wird oft das α/β -Verhältnis betrachtet. Überlebenskurven, die ein kleines α/β -Verhältnis (≈ 2 Gy) haben, werden als schulterförmig bezeichnet, da der quadratische Anteil hier eine signifikante Rolle spielt. Bei einem großen α/β -Verhältnis (≈ 10 Gy) spricht man von einer schwach ausgeprägten Schulter-Form, da der α -Wert die Kurve dominiert. Im Grenzfall von $\beta = 0$ werden Überlebenskurven als linear bezeichnet.

2.3.2 Das Giant Loop Binary Lesion Model

Das GLOBLE-Modell [3], [4] ist ein mechanistisches Modell zur Beschreibung des Zellüberlebens nach Photonenbestrahlung. Dafür wird die Anzahl und die räumliche Verteilung der strahleninduzierten DSB ausgewertet. Die ursprüngliche Variante [3] beschreibt das Überleben asynchroner Zellpopulationen, die neuere Variante [4] das zellzyklusspezifische Überleben. Bei der Erweiterung wird die zellzyklusabhängige Radiosensitivität von Zellen mit der Verfügbarkeit und der Fidelität von DNA-Reparaturwegen verknüpft. Im Rahmen dieser Arbeit wird sich immer auf die aktuelle Variante [4] bezogen, wenn von dem GLOBLE-Modell die Rede ist.

Eine Annahme des GLOBLE-Modells ist, dass die DSB die relevanten strahleninduzierten Schäden sind, welche zum Zelltod führen. Dabei wird die DSB-Verteilung auf einer Chromatinstruktur höherer Ordnung, den so genannten Chromatin-Loops (Abb. 3b), ausgewertet. Einzelne Chromatin-Loops mit einem DSB werden als isolierte DSB (iDSB), Chromatin-Loops mit zwei oder mehr DSB als komplexe DSB (cDSB) klassifiziert (Abb. 4c). Die hier verwendeten Werte sind 6 Gbp für die Genomgröße und 2 Mbp für die Größe der Chromatin-Loops, was zu 3000 Chromatin-Loops pro Zelle führt. Weiterhin wird un-

terschieden, mit welchem Reparaturweg die DSB repariert werden können; der Kombination aus DSB Klasse und Reparaturweg wird eine Letalität zugewiesen. Insgesamt wird im GLOBLE-Modell zwischen drei Fällen unterschieden: da HR als fehlerfrei angesehen wird, werden für HR reparierten iDSB sehr niedrige Letalität $\epsilon_{i,2}$ erwartet. NHEJ reparierte iDSB haben eine höhere Letalität $\epsilon_{i,1}$ da dieser Reparaturweg fehlerbehaftet ist. Die höchste Letalität wird von cDSB ϵ_c , unabhängig von dem Reparaturweg, erwartet. Bei den cDSB wird davon ausgegangen, dass auf Grund der Nähe der Schäden eine korrekte Zuordnung der DNA-Enden erschwert ist und damit eine korrekte Endverknüpfung durch NHEJ oder HR unwahrscheinlich wird. Deshalb wird für die numerischen Werte der Letalitäten die Beziehung

$$\epsilon_{i,2} \ll \epsilon_{i,1} \ll \epsilon_c \quad (9)$$

erwartet. Für die HR wird ein Schwesterchromatid, in räumlicher Nähe des beschädigten Chromatin-Loops, benötigt; deshalb kann diese nur bei iDSBs auf so genannten gepaarten Chromatin-Loops angewandt werden. Das NHEJ findet entsprechend auf den ungepaarten Chromatin-Loops statt. Die Reparaturwege selbst werden als Blackbox angesehen, d. h. diese werden nicht im Detail betrachtet. Es wird lediglich der Kombination aus DNA-Schaden und Reparaturweg eine Zellinaktivierungswahrscheinlichkeit zugeordnet. Die Hypothese bezüglich der Reparaturwegwahl ist hier, dass HR immer verwendet wird, wenn dies möglich ist, ansonsten wird NHEJ benutzt. Da die Verfügbarkeit der Reparaturwege keine Rolle für die Reparatur der cDSB spielt, ist es irrelevant, ob sich diese auf einem gepaarten oder ungepaarten Chromatin-Loops befinden. Die Überlebenswahrscheinlichkeit S wird mit

$$S(D, t) = \exp[-(\epsilon_{i,1} \cdot n_{i,1}(D, t) + \epsilon_{i,2} \cdot n_{i,2}(D, t) + \epsilon_c \cdot n_c(D, t))] \quad (10)$$

berechnet, der Parameter $n_{i,1}$ gibt die Anzahl der iDSB auf ungepaarten Chromatin-Loops, $n_{i,2}$ auf gepaarten Chromatin-Loops und n_c die Anzahl der cDSB an. Diese Werte hängen von der Dosis und dem Replikationsstatus der Zelle ab. Die Anzahl der jeweiligen Chromatin-Loops im Laufe des Zellzyklus ist in Abbildung 6 dargestellt. In der G1-Phase liegen alle 3000 Chromatin-Loops der Zelle als ungepaarte Chromatin-Loops vor. Im Laufe der S-Phase geht die Anzahl der ungepaarten Chromatin-Loops auf null zurück, während die gepaarten linear auf 6000 ansteigen. Während der G2-Phase wandeln sich die gepaarten Chromatin-Loops linear in ungepaarte um. Die DSB Induktionsrate pro Chromatin-Loops wird mit $y_{loop} = y_{DSB}/N_L$ aus der DSB Induktionsrate pro Gy (y_{DSB}) und der Anzahl der Chromatin-Loops (N_L) berechnet wird. Die DSB Induktionsrate beträgt 30 Gy^{-1} für Zellen der G1-Phase und skaliert mit dem DNA-Gehalt, sodass y_{loop} konstant 0.01 Gy^{-1} ist. Die Wahrscheinlichkeiten, bei einer Dosis D einen iDSB (p_i) oder einen cDSB (p_c) jeweils pro Chromatin-Loop zu erzeugen, werden mit

$$p_0(D) = \exp(-y_{loop} \cdot D) \quad (11)$$

$$p_i(D) = (y_{loop} \cdot D) \cdot \exp(-y_{loop} \cdot D) \quad (12)$$

$$p_c(D) = 1 - p_0(D) - p_i(D) \quad (13)$$

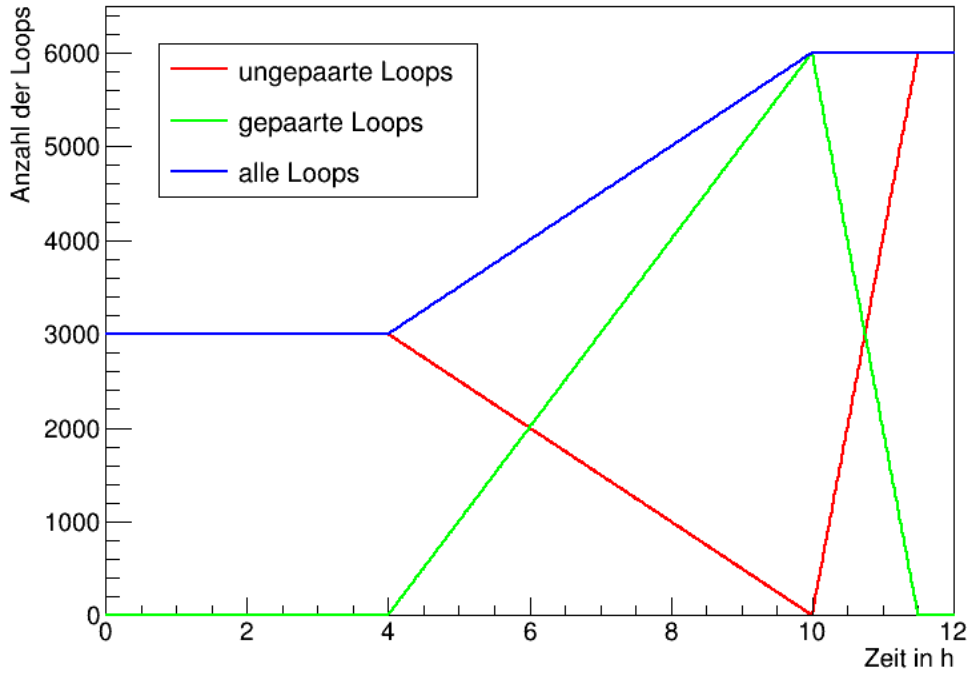


Abbildung 6: Anzahl der gepaarten, ungepaarten und gesamten Chromatin-Loops während des Zellzyklus von Hamster Zellen im GLOBLE-Modell [4].

berechnet. Mit diesen Wahrscheinlichkeiten und der Anzahl der gepaarten/ungepaarten Chromatin-Loops wird die Anzahl der iDSB auf ungepaarten Chromatin-Loops ($n_{i,1}$), iDSB auf gepaarten Chromatin-Loops ($n_{i,2}$) und cDSB (n_c) mit

$$n_{i,1}(D, t) = p_i(D) \cdot N_1(t) \quad (14)$$

$$n_{i,2}(D, t) = p_i(D) \cdot N_2(t) \quad (15)$$

$$n_c(D, t) = p_c(D) \cdot N_L(t) \quad (16)$$

bestimmt. Dabei bezeichnet N_1 die Anzahl der ungepaarten Chromatin-Loops, N_2 die Anzahl gepaarter Chromatin-Loops und N_L die Anzahl der gesamten Chromatin-Loops. Zur Berechnung des Zellüberlebens, bei Defiziten im NHEJ oder HR, wird die Letalität des beschädigten Reparaturweges durch die des nächstbesten zur Verfügung stehenden Reparaturweges (Gl. 10) ersetzt.

Die ursprüngliche Variante des GLOBLE-Modells [3] betrachtet lediglich die Anzahl der iDSB und cDSB und kann formal durch Gleichung 10, für den Zeitpunkt $t=0$ angesehen werden und vereinfacht sich dann zu

$$S(D) = \exp[-(\epsilon_i \cdot n_i(D) + \epsilon_c \cdot n_c(D))]. \quad (17)$$

Dadurch hat ϵ_i die Bedeutung der mittleren Letalität der iDSB und wird keinem konkretem Reparaturweg zugeordnet. Der Parameter ϵ_c behält seine Bedeutung als Letalität der cDSB. Die Anzahl der iDSB und cDSB (n_i und n_c) werden aus Gleichung 14-16 $n_{i,1}$ und n_c für den Zeitpunkt $t=0$ berechnet. Für diese Variante des GLOBLE-Modells wurde in Ref. [3] der folgende analytische Zusammenhang zwischen den Parametern ϵ_i, ϵ_c und den LQ-Parametern α, β hergestellt:

$$\alpha = \epsilon_i \cdot y_{DSB} \quad (18)$$

$$\beta = \left(\frac{\epsilon_c}{2} - \frac{\alpha}{y_{DSB}} \right) \cdot \frac{y_{DSB}^2}{N_L} \quad (19)$$

mit der Doppelstrangbruch-Induktionsrate y_{DSB} und der Anzahl der Chromatin-Loops N_L . Eine Anpassung davon an das zellzyklusspezifische GLOBLE-Modell findet sich in Kapitel 3.1.9.

2.3.3 Das Local Effect Model

Das LEM [11]–[15] wurde entwickelt, um das Überleben von Säugerzellen nach Bestrahlung mit geladenen Teilchen aus dem entsprechenden Überleben nach Photonenbestrahlung zu extrapolieren. Das LEM wurde in mehreren Versionen an der GSI (Darmstadt) entwickelt. In dieser Arbeit wird die vierte Version des LEM [14] oder *Local Effect Model full simulation* [15] (LEMfs) verwendet. Die grundlegende Annahme des LEM ist, dass gleiche lokale Dosen zu gleichen Effekten führt, unabhängig davon, ob diese durch Photonen oder Ionenstrahlung deponiert wurde. Ebenso wird angenommen, dass das gleiche DNA-Schadensmuster zum selben biologischen Effekt führt. Zur Berechnung des Effekts der Ionenstrahlung wird die lokale Dosisverteilung der Ionen anhand des Effekts der Photonenstrahlung, wie im Folgenden beschrieben, ausgewertet.

Die radiale Dosisverteilung im Local Effect Model

Geladene Teilchen deponieren ihre Dosis entlang ihrer Spur und radial um diese verteilt. Die deponierte Dosis ist proportional zu $1/r^2$ mit dem Radius r . Im LEM wird angenommen, dass innerhalb der inneren Spur mit dem Radius r_{min} die Dosis konstant ist und oberhalb eines maximalen Radius r_{max} auf Null abfällt (Abb. 2a). Die radiale Dosisverteilung $D(r)$ wird durch

$$D(r) = \begin{cases} \lambda \cdot \frac{LET}{r_{min}^2} & : r < r_{min} \\ \lambda \cdot \frac{LET}{r^2} & : r_{min} \leq r \leq r_{max} \\ 0 & : r_{max} < r \end{cases} \quad (20)$$

mit dem LET und der Normierungskonstante λ , berechnet. Die Konstante λ wird so gewählt, dass das radiale Integral den LET des Teilchens wiedergibt. Der innere Radius ist geschwindigkeitsabhängig und wird mit $r_{min} = r_c \cdot \beta$, mit dem inneren Kernradius $r_c = 6.5$ nm und dem relativistischen $\beta = v/c$ berechnet. Der äußere Radius r_{max} ist energieabhängig und wird mit $r_{max} = \gamma E^\delta$, mit der Energie in MeV, dem spezifischen Spurradius bei der Energie E von 1 MeV/u $\gamma = 0.063 \mu\text{m} \cdot (\text{MeV/u})^{-1.7}$ und dem Exponenten $\delta = 1.7$ berechnet [14].

Um die Verbreiterung des Effekts, welche durch die Radikaldiffusion entsteht, zu beschreiben, wird eine virtuelle Dosisverteilung verwendet. Dabei handelt es sich um die Summe aus der physikalischen Dosis und der Wirkung der Radikale. Das wird realisiert, indem die radiale Dosisverteilung mit einer zweidimensionalen Gauß-Verteilung gefaltet wird. Die Breite $\sigma = 4 \text{ nm}$ der Verteilung gibt die Diffusionslänge wieder. Die resultierende virtuelle radiale Dosisverteilung \tilde{D} wird durch

$$\tilde{D}(r) = \frac{e^{-r^2/2\sigma^2}}{\sigma^2} \int_0^\infty dr' r' e^{-r'^2/2\sigma^2} \cdot I_0\left(\frac{rr'}{\sigma^2}\right) \cdot D(r') \quad (21)$$

mit dem direkten Beitrag der radialen Dosisverteilung $D(r)$ aus Gleichung 20 und der modifizierten Bessel-Funktion nullter Ordnung I_0 berechnet. Dabei handelt es sich um eine Vereinfachung, bei der die gesamte physikalische Dosis durch die Radikaldiffusion ausgeschmiert wird.

Lokaler Effekt

Für die Berechnung der Überlebenswahrscheinlichkeit nach Ionenbestrahlung wird aus der lokalen Dosisverteilung (Gl. 21) die DNA-Schadensverteilung berechnet. Analog zum GLOBLE-Modell (Kap. 2.3.2) wird auch hier angenommen, dass die DNA das kritische Target bezüglich des Zellüberlebens ist und dass die DSB die relevanten Schäden sind. Die räumliche Verteilung der DSB auf der μm -Skala spielt ebenfalls eine wichtige Rolle³. Die lokale Dosisverteilung wird mit der DSB Induktionsrate ($y_{DSB} = 30 \text{ DSB/Gy}$) ausgewertet. Es muss berücksichtigt werden, dass bei hohen lokalen Dosen die Clusterung von SSB ebenfalls DSB erzeugt. Dies wird durch den Dosisverstärkungsfaktor (η -Faktor)

$$\eta = \frac{N(DSB) + N(SSB + SSB = DSB)}{N(DSB)}, \quad (22)$$

mit der Anzahl der DSB $N(DSB)$ und der DSB, die aus SSB gebildet werden $N(SSB + SSB = DSB)$, und der SSB Ausbeute von 1250 SSB/Gy , berücksichtigt [12]. Die älteren LEM-Publikationen verwenden zur Abschätzung des η -Faktors eine Monte-Carlo-Methode. Eine neuere Publikation [81] stellt eine analytische Methode zu dessen Berechnung vor.

Die Anzahl der DSB, pro kubisches Subvolumen der Kantenlänge 540 nm^\dagger , wird mit einem Monte-Carlo Verfahren bestimmt. Daraus wird die Anzahl der Subvolumina mit iDSB und cDSB aus der Durchquerung eines einzelnen Ions bestimmt. Aus der Anzahl der Schäden wird die Komplexität C aus

$$C = \frac{N_{cDSB}^{Ion}}{N_{cDSB}^{Ion} + N_{iDSB}^{Ion}} \quad (23)$$

berechnet, mit der Anzahl der iDSB N_{iDSB}^{Ion} und cDSB N_{cDSB}^{Ion} . Anschließend wird die Photonen äquivalente Dosis D_{eq} berechnet, um die gleiche Schadenskomplexität zu induzieren. Der äquivalente Effekt wird mit $E_{eq} = -\ln S_\gamma(D_{eq})$ berechnet. Der Effekt eines einzelnen Ions E_I wird aus

³ Historisch gesehen wurde diese Annahme jedoch zuerst in LEM gemacht, daraus hat sich dann später das GLOBLE-Modell für Photonen entwickelt.

[†] Diese Subvolumina sind das Äquivalent der Chromatin-Loops in GLOBLE.

$$E_I = \frac{N_{iDSB}^{Ion}}{N_{iDSB}^{photon}} \cdot E_{eq} = \frac{N_{cDSB}^{Ion}}{N_{cDSB}^{photon}} \cdot E_{eq} \quad (24)$$

berechnet und damit die Effektivität eines einzelnen Ions durch $\alpha_I = E_I/D_I$. Das Zellüberleben nach Ionenbestrahlung wird nun ebenfalls durch das LQ-Modell wiedergegeben, mit den Parametern $\alpha_{ion} = \alpha_I$ und $\beta_{ion} = (s_{max} - \alpha_{ion}/2D_t)$. Die Werte s_{max} und D_t entsprechen den Parameter des LQL-Modells zur Parametrisierung der Dosiseffektkurve nach Photonenbestrahlung.

Die Berechnung des Zellüberlebens nach Ionenbestrahlung durch LEM geschieht auf der Grundlage eines einzelnen Ions pro Zellkern, auch LEM-Ein-Teilchen-Simulation genannt. Ausgehend davon wird der Effekt für jede andere Dosis extrapoliert. Im LEMfs [15] wird die tatsächliche erwartete Anzahl der Ionen für eine bestimmte Dosis berechnet. Die Ionentrajektorien werden zufällig über den Zellkern verteilt. Die Anzahl der erwarteten DSB wird entsprechend der lokalen Dosis berechnet und das Schadensmuster wird schließlich analog zur LEM-Ein-Teilchen-Simulation ausgewertet. Der Vorteil dieser Methode ist eine bessere Beschreibung der quadratischen Komponente der LQ-Überlebenskurve, also die *inter-track*-Wechselwirkung.

2.3.4 Relative biologische Wirksamkeit

Die RBE bezeichnet den Quotient der Dosen zweier Strahlenarten welche benötigt werden, um den gleichen biologischen Effekt zu erzielen. In dieser Arbeit wird die RBE von Ionenstrahlung, mit Photonenstrahlung als Referenz, betrachtet. Damit ist die RBE

$$RBE = \left. \frac{D_\gamma}{D_I} \right|_{\text{Isoeffekt}} \quad (25)$$

mit der Photonendosis D_γ und Ionendosis D_I . Es muss ein genauer biologischer Endpunkt definiert werden, der betrachtet wird. Dies ist z. B. die RBE_{10} für 10 % Überleben oder RBE_α als α_I/α_γ mit den linearen Parametern des LQ-Modells α_γ für Photonen- und α_I für Ionenstrahlung.

2.3.5 Ein ab initio Modell der DNA-Schadensinduktion durch geladene Teilchen

Als Beispiel eines *ab initio* Modells zur DNA-Schadensinduktion werden die Arbeiten von Nikjoo et al. mit dem KURBUC *track-structure code* [25], [35], [36] betrachtet. Diese Simulation verläuft in drei Schritten:

1. primäre Ionisationen, δ -Elektronen und Radikale werden mit einer Monte-Carlo-Methode simuliert
2. primäre Ionisationen und Radikale werden mit zufällig verteilten DNA-Strängen überlagert, die daraus entstehende chemische Veränderung der DNA wird ausgewertet
3. chemische Veränderungen der DNA werden nach einem Schema in DNA-Schadensklassen eingeteilt.

Als Monte-Carlo *code* für die Simulation der Ionenbahnstruktur wird PITS [82] verwendet, um die primäre Ionisation und die δ -Elektronen zu generieren. Der Elektronentransport-Code für die Generierung

der δ -Elektronen und chemischen Spuren ist CPA100 [83]. Das Ergebnis dieses Rechenschritts ist die räumliche Verteilung aller inelastischen Interaktionen des primären Teilchens, aller Sekundärelektronen, die Energiedeposition jeder Wechselwirkung, die Art der jeweiligen Interaktion sowie die Art und Position der Radikale. Diese Berechnungen wurden in Wasser durchgeführt, um das die DNA umgebende Medium zu simulieren.

Im nächsten Schritt werden die Spuren in virtuellen Zylindern eingeschlossen, welche alle primären und sekundären Elektronen enthalten. Innerhalb dieser virtuellen Zylinder werden zufällig lineare DNA-Segmente mit einer zufälligen Ausrichtung verteilt [84]. Die direkte Interaktion wird ausgewertet, indem die Ionisationen der DNA durch die Primär- oder Sekundärelektronen ausgewertet wird. Die Auswertung der indirekten Interaktion wird ausgeführt, indem die Radikale in einem Abstand von 4 nm um die DNA 1 ns lang verfolgt werden. Ein Strangbruch wird verursacht wenn: 1. eine Energie von mindestens 17.5 eV in einem Zucker-Phosphat Volumen deponiert wird oder 2. mit einer Wahrscheinlichkeit von 0.13, wenn der Strang von einem Radikal erreicht wird.

Schließlich werden die chemischen Alterationen der DNA in Schadensklassen eingeteilt. Die Arbeiten von Nikjoo et al. enthalten unterschiedliche Schemata der Schadensklassen. Im Kontext dieser Arbeit wird dasjenige verwendet, welches nur die Strangbrüche betrachtet, unabhängig davon ob durch direkte oder indirekte Interaktion verursacht. Basenschäden werden bei diesem Schema vernachlässigt. Für die Auswertung der Schäden werden die DNA-Stränge in Segmente von 54 bp eingeteilt. Es wird der komplexeste Schaden des jeweiligen Segments gewertet. Eine chemische Veränderung des Fragments, jedoch ohne Strangbruch, wird als *no break (NB)* gewertet. Einzelne SSB werden als SSB gewertet, zwei SSB auf dem gleichen Strang als SSB⁺ und zwei SSB auf gegenüberliegenden Strängen, die weiter als 10 bp voneinander entfernt sind, als 2SSB. Zwei SSB auf gegenüberliegenden Strängen, die weniger als 10 bp voneinander entfernt sind, werden als DSB gezählt, DSB mit einem SSB innerhalb von 10 bp als DSB⁺ und Segmente, die zwei DSB enthalten, als DSB⁺⁺. Weiterhin können diese Schäden zu komplexen SSB ($SSB_c = SSB^+ + 2SSB$) und komplexen DSB ($DSB_c = DSB^+ + DSB^{++}$) zusammengefasst werden. Beispiele dieser Schadensklassen sind in Abbildung 4b dargestellt.



3 Methoden

Die Methoden sind in drei Kategorien eingeteilt: Methoden zur Modellierung des Zellüberlebens in Kapitel 3.1, die experimentellen Methoden zur Bestimmung des Zellüberlebens synchroner und asynchroner CHO-Zellen in Kapitel 3.2 und die Methoden zur Untersuchung der amorphen Bahnstruktur in Kapitel 3.3. Dabei handelt es sich zum Teil um etablierte Methoden, welche an die durchgeführten Untersuchungen angepasst wurden. Zum Teil wurden Methoden im Zusammenhang dieser Arbeit etabliert. Genauer wird in den Unterkapiteln aufgeführt.

3.1 Modellierung des Zellüberlebens

Für die Modellierung des Zellüberlebens wird für Photonenstrahlung das GLOBLE-Modell (Kap. 2.3.2) und für Ionenbestrahlung das LEM (Kap. 2.3.3) verwendet. Als Input für das LEM wird das LQL-Modell (Kap. 2.3.1) zur deskriptiven Beschreibung der Daten eingesetzt. Die im Folgenden vorgestellten Methoden stellen konkrete Anwendungsfälle der Modelle für die untersuchten Experimente dar.

3.1.1 Parametrisierung von Zellpopulationen

In dieser Arbeit wird das Überleben einzelner Zellzyklusphasen modelliert. Dafür ist eine Beschreibung der untersuchten Zellpopulation erforderlich. Im Folgenden werden Methoden zur Parametrisierung synchroner und asynchroner Zellpopulationen vorgestellt.

Synchrone Zellen

Bei der Auswertung von Überlebenskurven synchroner Zellen muss berücksichtigt werden, dass Zellen niemals ideal an einer bestimmten Position des Zellzyklus synchronisiert sind, sondern um eine Position herum verteilt sind. Ferner wurden die Zellen mit unterschiedlichen Methoden (*mitotic shake-off*, Elutritation, Kontaktinhibierung) synchronisiert, woraus unterschiedliche Synchronisationsqualitäten resultieren. Eine Parametrisierung wird eingeführt, welche dies berücksichtigt und damit erlaubt, Überlebenskurven verschiedener Synchronisationsqualitäten zu vergleichen. Bei dem hier verwendeten Ansatz wird angenommen, dass die Zellpopulationen einer Gaußverteilung mit der Synchronisationsbreite σ_{sync} um eine bestimmte Position im Zellzyklus verteilt sind. Soweit entspricht diese Parametrisierung der von Hufnagl et al. [4] beschriebenen Vorgehensweise. In dieser Arbeit wird zusätzlich berücksichtigt, dass Zellen eine gewisse Zeit nach Aussaat in der sogenannten *lag*-Phase verbringen, bevor sie im Zellzyklus in die G1- und weitere Phasen kommen. Die Zellpopulationsverteilung η ist durch

$$\eta(t, \tau) = \exp \left[-\frac{1}{2} \left(\frac{\tau - t - t_0}{\sigma_{sync}} \right)^2 \right] \quad (26)$$

gegeben und gibt den Anteil der Zellen zur Zeit nach Mitose τ , zum Zeitpunkt t nach Synchronisation, mit der Länge der Lag-Phase t_0 und Synchronisationsbreite σ_{sync} an. Um Überlebenskurven synchroner Zellen miteinander vergleichen zu können, kann die Zeit nach Synchronisation t in Zeit nach Mitose τ mit $\tau = t - t_0$ umgerechnet werden. Da für jede Zelle, die den ersten Zellzyklus durchlaufen hat zwei neue am Anfang des nächsten entstehen, muss die Zellpopulationsverteilung intervallweise ausgewertet werden. Dies ergibt die Zellzyklusverteilung ρ

$$\tilde{\rho}(\tau, t) = \sum_k 2^k \cdot \eta(\tau + kT, t) + \delta(\tau) \cdot \int_{-(t_0 + 5 \cdot \sigma_{sync})}^0 \eta(\tau, t) d\tau \quad (27)$$

$$\rho(\tau, t) = \frac{\tilde{\rho}(\tau, t)}{c} \quad (28)$$

mit der nicht Normierten Verteilung $\tilde{\rho}$, der Zellverdopplungszeit T , dem Zähler der Zellteilungen nach der Synchronisation k und dem Normierungsfaktor c . Durch den zweiten Term werden die Zellen in der Lag-Phase mithilfe der Delta-Distribution δ formal dem Zeitpunkt $\tau = 0$ zugeordnet. Die Zelllinien, die in dieser Arbeit untersucht wurden, haben eine Zellverdopplungszeit von $T = 12$ h und wurden bis zu 15 h nach Synchronisation untersucht. Entsprechend ist es wichtig, die Gleichung 28 für $k = 0, 1$ auszuwerten, um die Zellteilung zu berücksichtigen. Durch die Zellteilung kommen neue Zellen hinzu, wodurch der Normierungsfaktor c keine Konstante ist und für jeden Wert von t neu ausgewertet mit $c = \int_0^T \tilde{\rho}(\tau, t) d\tau$ werden muss. Zur Berechnung des Anteils der Zellen f in G1-, S- und G2/M-Phase wird die Dichte ρ über dem entsprechenden Intervall des Zyklus integriert:

$$f_{G1} = \int_0^{T_{G1}} \rho(\tau, t) d\tau \quad (29)$$

$$f_S = \int_{T_{G1}}^{T_{G1}+T_S} \rho(\tau, t) d\tau \quad (30)$$

$$f_{G2/M} = \int_{T_{G1}+T_S}^T \rho(\tau, t) d\tau. \quad (31)$$

Hierbei sind T_{G1} , T_S und $T_{G2/M}$ die Längen der G1-, S- und G2/M-Phase (entsprechend 4 h, 6 h und 2 h) und es gilt $T = T_{G1} + T_S + T_{G2/M}$. Die G2- und M-Phase wird bei dieser Art der Untersuchungen zusammengefasst, da sie sich auf Grund ihres DNA-Gehalts nicht unterscheiden lassen. Die Messungen, welche zur Analyse des Zellzyklus zur Verfügung stehen, wurden in dieser Arbeit mit der in Kapitel 3.2.1 beschriebenen Methode der Durchflusszytometrie durchgeführt. Bei Daten aus anderen Quellen wurde ähnlich verfahren. Daraus ergeben sich die Anteile der Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten in einzelnen Zellzyklusphasen $(t, f_{G1}, f_S, f_{G2/M})$. Zur Bestimmung der Populationsparameter werden die Funktionen aus den Gleichungen 29-31 simultan mit der in Kapitel 3.1.4 beschriebenen Methode an Daten angepasst. Die Unsicherheiten der Anteile von Zellen in den einzelnen Zellzyklusphasen werden als ein konstanter Wert angenommen. Die Untersuchung der quadrierten Differenzen von Datenpunkten und den angepassten Funktionen ergab, dass eine Unsicherheit von $\sigma_f = 0.1$ im Mittel zu einem reduzierten χ^2 -Wert von 1 führt und damit einen angemessenen Schätzwert für die Unsicherheit darstellt.

Bei diesem Vorgehen wird die Zellzyklusverteilung nicht nur aus der Messung eines einzelnen Zeitpunktes, sondern aus der zeitlichen Entwicklung aller Punkte der Messreihe bestimmt. Dieser zeitliche Verlauf wird im Folgenden auch als Zellzykluskinetik bezeichnet.

Asynchrone Zellen

Die Zellzyklusverteilung asynchroner Zellen wird als Exponentialfunktion angenommen, welche durch

$$\rho(\tau) = \exp\left(-\frac{\tau \cdot \log(2)}{T}\right) \quad (32)$$

zur Zeit nach Mitose τ mit der Zellverdopplungszeit T gegeben ist. Dadurch wird die Tatsache berücksichtigt, dass es mehr Zellen am Anfang des Zellzyklus als am Ende gibt. Das ergibt sich daraus, dass für jede Zelle die den Zellzyklus beendet, zwei neue am Anfang des Zyklus dazukommen.

3.1.2 Vorhersage von Zellüberleben durch das GLOBLE-Modell

Das Zellüberleben einer ideal synchronisierten Zellpopulation hängt von der Dosis und der Position im Zellzyklus (bzw. der Zeit nach Mitose) ab. Für die Berechnung des Zellpopulation-Überlebens wird über die Zellüberleben der Subpopulationen, gewichtet mit ihrem relativen Beitrag, integriert. Das Überleben ist dann

$$S(D, t) = \int_0^T S(D, \tau) \cdot \rho(\tau, t) d\tau \quad (33)$$

mit der Dosis D und Zeit nach Synchronisation t . Das Überleben $S(D, \tau)$ ist das zellzyklusspezifische Überleben als Funktion der Zeit nach Mitose τ und $\rho(\tau, t)$ die Zellzyklusverteilung zur Zeit t nach Synchronisation. Hierbei handelt es sich um die gleiche Methode wie in der Arbeit von Hufnagl et al. [4]. Die Darstellung wurde dahingehend angepasst, dass die hier untersuchte Dosis- und Zeitabhängigkeit besser veranschaulicht wird. Der Ausdruck $S(D, \tau)$ bezeichnet im Folgenden das Zellüberleben der Zellzyklusposition τ und $S(D, t)$ steht für das Überleben einer synchronen Population zum Zeitpunkt t nach Synchronisation. Die Zeitabhängigkeit des Überlebens bezieht sich im Folgenden auf die Zeit nach Synchronisation. Für $S(D, \tau)$ wird das zellzyklusspezifische GLOBLE-Modell bzw. LEM eingesetzt. Bei einer Modellanpassung wird das Zellüberleben über Gleichung 33 auf die in Kapitel 3.1.3 beschriebene Weise an die Daten angepasst.

Wenn das GLOBLE-Modell das zellzyklusspezifische Überleben wiedergibt, müsste es auch möglich sein, das Überleben asynchroner Zellpopulationen durch die Summe der synchronen Subpopulationen zu beschreiben. Die Zellzyklusverteilung hierfür wird durch Gleichung 32 beschrieben. Wird diese in Gleichung 33 eingesetzt, entfällt die Zeitabhängigkeit. Weiterhin muss beachtet werden, dass das GLOBLE-Modell drei freie Parameter hat. Eine einzelne Überlebenskurve im Niedrigdosisbereich wird typischerweise vom LQ-Modell beschrieben. Daraus kann man folgern, dass nur zwei Parameter an eine Überlebenskurve angepasst werden können, ohne dass diese überbestimmt ist. Im Falle synchroner Zellen ergab sich dieses Problem nicht, da diese in den bisher betrachteten Fällen immer an mindestens zwei Überlebenskurven simultan angepasst wurden. Um die Zahl der freien Parameter im GLOBLE-Modell zu reduzieren, kann die Letalität der HR reparierten iDSB auf null gesetzt werden. Zum einen legt die Arbeit von Hufnagl et al. [4] durch theoretische Überlegungen und Anpassung an Daten dar, dass die HR fehlerfrei ist, sodass $\epsilon_{i,2}$ mit null verträglich ist. Zum anderen deuten die Verhältnisse der Letalitäten untereinander (Gl. 9) darauf hin, dass das eine valide Näherung ist.

Diese Methode eignet sich ebenfalls, um aus LQ-Parametern von Überlebenskurven asynchroner Zellpopulation die GLOBLE-Parameter zu bestimmen. Dafür wird das GLOBLE-Modell, in Form von Gleichung 33, an Überlebenskurven des LQ-Modells im Dosisbereich 0-10 Gy angepasst.

3.1.3 Mathematische Aufbereitung von Überlebenskurven

In diesem Kapitel wird beschrieben, wie die Messungen von Überlebenskurven durch den klonogenen Überlebensassay für die weitere Analyse aufbereitet werden und wie die statistischen Unsicherheiten bestimmt werden. Bei der Anpassung von Fit-Kurven an das Zellüberleben S wird im Folgenden grundsätzlich der Effekt $\nu (= -\ln(S))$ angepasst. Da in den meisten Anwendungen dieser Arbeit der Effekt ausgewertet wird, ergibt sich durch dieser Art der Anpassung eine bessere Beschreibung [85].

Bei der Messung des klonogenen Überlebens durch die in Kapitel 3.2.3 vorgestellte Methode wird das Produkt aus Zellüberleben (S) und Plattiereffizienz (PE), also $S \cdot PE$, gemessen. Die Daten müssen also auf die PE normiert werden um das Zellüberleben zu erhalten. Die übliche Methode dafür ist, den Mittelwert von $S \cdot PE$ bei allen unbestrahlten Proben zu verwenden, da dort im Sinne der Definition des Zellüberlebens $S = 1$ gilt. Um die statistische Unsicherheit dieses Wertes zu reduzieren, wird die PE in dieser Arbeit aus einer Anpassung des LQ-Modells an alle Datenpunkte bestimmt. Die Voraussetzung dafür ist, dass der Dosis-Effekt-Zusammenhang bekannt ist. Die hier betrachteten Überlebenskurven lassen sich durch das LQ-Modell empirisch beschreiben. Entsprechend wird das LQ-Modell ($-\ln(S) = \nu = c + \alpha \cdot D + \beta \cdot D^2$) mit der Konstanten c an die Daten des klonogenen Assays angepasst. Die PE berechnet sich aus $PE = \exp[-c]$, da auch hier gilt $S(0 \text{ Gy}) = 1$. Da die Daten anderer Autoren bereits auf die PE normiert wurden, jedoch nicht immer klar ist mit welcher Methode, wird für eine bessere Vergleichbarkeit diese Korrektur auf alle Überlebenskurven angewendet. Der dabei bestimmte Wert ist dann nicht die PE der Zellen, sondern ein Korrekturfaktor der ursprünglich bestimmten PE .

Als Schätzung der relativen Unsicherheit des Überlebens wird der Erfahrungswert von 0.1 verwendet [86]. Nach dem Gauß'schen Fehlerfortpflanzungsgesetz ist damit der absolute Fehler des Effekts 0.1. Eine Schätzung der Unsicherheit aus den Daten einzelner Dosispunkte wäre hier nicht praktikabel, da diese aufgrund der Stichprobenanzahl einer großen Fluktuation unterliegt.

3.1.4 Simultane Funktionsanpassung

Bei einem typischen Fit werden die Parameter $\vec{\alpha}$ einer einzelnen Funktion f dahingehend optimiert, dass der zu beschreibende Datensatz x_j, y_i am besten beschrieben wird. Dies wird durch eine Minimierung des χ^2 erreicht. Bei der Anpassung der Populationsparameter oder der GLOBLE-Letalitäten müssen hingegen mehrere Funktionen simultan an jeweils unterschiedliche Daten angepasst werden. Dabei teilen die Funktionen einen identischen Parametersatz. Dafür wird die übliche Methode verallgemeinert, um mehrere Datensätze gleichzeitig anpassen zu können. Eine gemeinsame χ^2 -Funktion berücksichtigt alle betrachteten Daten und Funktionen. Das χ^2 wird aus

$$\chi^2(\vec{\alpha}) = \sum_i^N \sum_j^M \left(\frac{f_i(x_{ij}) - y_{ij}}{\sigma_{ij}} \right)^2 \quad (34)$$

berechnet. Die Werte (x_{ij}, y_{ij}) bezeichnen den experimentellen j-ten x,y-Datenpunkt der i-ten Datenreihe mit der Standardabweichung σ_{ij} , an welche die Funktion f_i angepasst wird. Anschließend werden die Werte $\tilde{\alpha}$ bestimmt, die diese χ^2 Funktion minimieren. Die Implementierung dieser Optimierung wurde für diese Arbeit mit der Programmiersprache C++ unter Zuhilfenahme des *Data Analysis Framework ROOT* V. 6.06/02 umgesetzt.

3.1.5 Darstellung des Überlebens als Funktion der Zeit

Zellüberlebenskurven synchroner Zellen werden zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Synchronisation gemessen. Daraus erhält man das Zellüberleben als Funktion der Zeit nach Synchronisation t und der Dosis D . Zur besseren Veranschaulichung des zellzyklusspezifischen Verhaltens wird das Überleben als Funktion der Zeit t bei einer konstanten Dosis dargestellt. Bei den untersuchten Daten ist dies nicht ohne Weiteres möglich. Bei den Daten unterliegen die einzelnen Datenpunkte zum einen statistischen Fluktuationen und zum anderen sind die Dosen zwischen den einzelnen Überlebenskurven nicht identisch. Um dies auszugleichen, wird bei Betrachtung der Daten in dieser Darstellung das LQ-Modell an jede Überlebenskurve angepasst (Kap. 3.1.3). Die LQ-Kurven werden dann entsprechend der benötigten Dosis ausgewertet. Die Unsicherheiten des Überlebens werden durch die Gauß'sche Fehlerfortpflanzung aus der angepassten LQ-Kurve bestimmt.

3.1.6 Berücksichtigung von Reparaturdefiziten durch das GLOBLE-Modell

Die Berücksichtigung defekter Reparaturwege bei der Vorhersage des Überlebens durch GLOBLE erfolgt wie in Kapitel 2.3.2 beschrieben. Für HR-defiziente Zellen bedeutet dies, dass die Letalität HR-reparierter iDSB ($\epsilon_{i,2}$) den Wert der Letalität NHEJ-reparierter iDSB ($\epsilon_{i,1}$) annimmt. Bei NHEJ-defizienten Zellen nimmt die Letalität NHEJ-reparierter iDSB den Wert der Letalität der cDSB (ϵ_c) an. Steht HR als auch NHEJ nicht zur Verfügung, haben alle iDSB die Letalität der cDSB $\epsilon_{i,1} = \epsilon_{i,2} = \epsilon_c$. Dies wurde bereits in der Arbeit von Hufnagl et al. [4] für synchrone Zellen gezeigt. Neu in dieser Arbeit ist, dass darüber hinaus das Überleben asynchroner reparaturdefizienter Zellen beschrieben wird. Dafür wird die Überlebenskurve des GLOBLE-Modells (Kap. 3.1.1) entsprechend der verfügbaren/defizienten Reparaturwegen modifiziert.

3.1.7 Modifikationen des GLOBLE-Modells

Bei der Modellierung des zellzyklusspezifischen Überlebens durch das GLOBLE-Modell werden mehrere Vereinfachungen bezüglich der Replikationsdynamik, Reparaturwegwahl, DNA-Organisation und Zusammenhänge zwischen DNA-Schaden und Überleben getroffen. Nun werden zwei Modifikationen des GLOBLE-Modells vorgestellt, die es erlauben, die Auswirkung alternativer Hypothesen bezüglich der Vereinfachungen auf die Vorhersagen mit Daten zu vergleichen.

GLOBLE-MS

Bei der GLOBLE-MS-Variante (MS für Mitte-S-Phase) des GLOBLE-Modells wird berücksichtigt, dass die Integrität unterschiedlicher DNA-Regionen unterschiedlich wichtig für das Zellüberleben ist [30]. In GLOBLE und LEM wird angenommen, dass die genetische Integrität jedes Chromatin-Loops gleich wichtig für das Zellüberleben ist. Daraus folgt, dass iDSB und cDSB immer mit der gleichen Wahrscheinlichkeit zur Zellinaktivierung führen. Es muss jedoch bedacht werden, dass während der S-Phase zuerst

die euchromatischen, kodierenden sowie die häufig transkribierten Bereiche der DNA repliziert werden [48], [50]–[53]. Diese unterschiedliche Eigenschaften der DNA treten oft gemeinsam auf. Frührepliziertes Chromatin weist weniger Mutationen auf, als das spätreplizierte. Dies ist vermutlich daraufzuführen, dass die HR für diese Chromatinabschnitte zur Verfügung steht, sobald diese repliziert wurden und damit für einen insgesamt längeren Zeitraum [87]–[89]. Deshalb wird im GLOBLE-MS-Modell angenommen, dass eine fehlerfreie Reparatur der iDSB in den frühreplizierten Bereichen wichtiger für die genomische Integrität der Zelle ist als die der spätreplizierten. Bei cDSB wird davon ausgegangen, dass diese in allen Bereichen der DNA zu schweren Schäden führen können, welche die Integrität der DNA stark beschädigt. Darauf basierend wird die DNA in zwei Klassen eingeteilt: früh- und spätreplizierte DNA. Die Grenze wird in der Mitte der S-Phase gezogen. Die Einteilung der DNA in der Mitte der S-Phase in früh- und spätreplizierte ist heuristisch gewählt, da der Großteil des Euchromatins dann repliziert ist [48], [49]. Es wird angenommen, dass die frühreplizierte DNA anfälliger für das residuale Schadensspektrum nach Reparatur der iDSB durch NHEJ ist. Bei der spätreplizierten DNA werden diese Schäden toleriert. Um dies zu simulieren wird diesen Schäden die Letalität der fehlerfreie HR zugewiesen.

Dieses Verhalten wird innerhalb des Modells imitiert, indem der zeitliche Verlauf der gepaarten und ungepaarten Chromatin-Loops während der S-Phase verändert wird. Die Anzahl der jeweiligen Chromatin-Loops ist als Funktion der Zeit in Abbildung 7 dargestellt. Hierbei werden alle Chromatin-Loops ab Mitte der S-Phase als gepaarte Chromatin-Loops angesehen. Dabei handelt es sich um eine Vereinfachung, durch die sich die Bedeutung der gepaarten Chromatin-Loops ändert. Gepaarte Chromatin-Loops sind nun diejenigen der frühreplizierten DNA, von denen eine Kopie in räumlicher Nähe vorliegt, oder Chromatin-Loops der spätreplizierten DNA, deren Letalität der von HR reparierten iDSB entspricht. An dieser Stelle müsste beachtet werden, dass die Letalität der iDSB innerhalb der spätreplizierten DNA ebenfalls in der G1- und G2-Phase der HR reparierten iDSB entsprechen sollte. Das wird zunächst vernachlässigt, da in erster Näherung nur der Einfluss auf die S-Phase untersucht werden soll. Ansonsten funktioniert die Vorhersagemethode des Überlebens durch das GLOBLE-MS-Modell identisch zu der des GLOBLE-Modells.

GLOBLE-scale

Im GLOBLE-Modell wird angenommen, dass der Effekt proportional zur Gesamtzahl der DSB ist. Im Unterschied dazu wird bei dem GLOBLE-scale-Modell angenommen, dass der Effekt proportional zum Quotienten aus DNA-Schäden und DNA-Gehalt ist. Dadurch soll berücksichtigt werden, dass das replizierte Schwesterchromatid als redundante Kopie der DNA vorliegt. Dadurch kann im Falle einer Schädigung zumindest eine intakte Tochterzelle aus der folgenden Zellteilung hervorgehen. Das Überleben des GLOBLE-scale-Modells wird durch

$$S(D, t) = \exp[-(\epsilon_{i,1} \cdot n_{i,1}(D, t) + \epsilon_{i,2} \cdot n_{i,2}(D, t) + \epsilon_c \cdot n_c(D, t))/f] \quad (35)$$

berechnet. Dies entspricht dem Überleben des GLOBLE-Modells (Gl. 10), bei dem der Effekt $\nu = -\ln S$ durch den relativen DNA-Gehalt-Faktor f geteilt wird. Dieser wird durch $f = N_L(\tau)/N_L(0)$, mit der Anzahl der Chromatin-Loops am Anfang des Zellzyklus und der Anzahl der Chromatin-Loops $N_L(\tau)$ zum betrachteten Zeitpunkt τ nach Mitose berechnet.

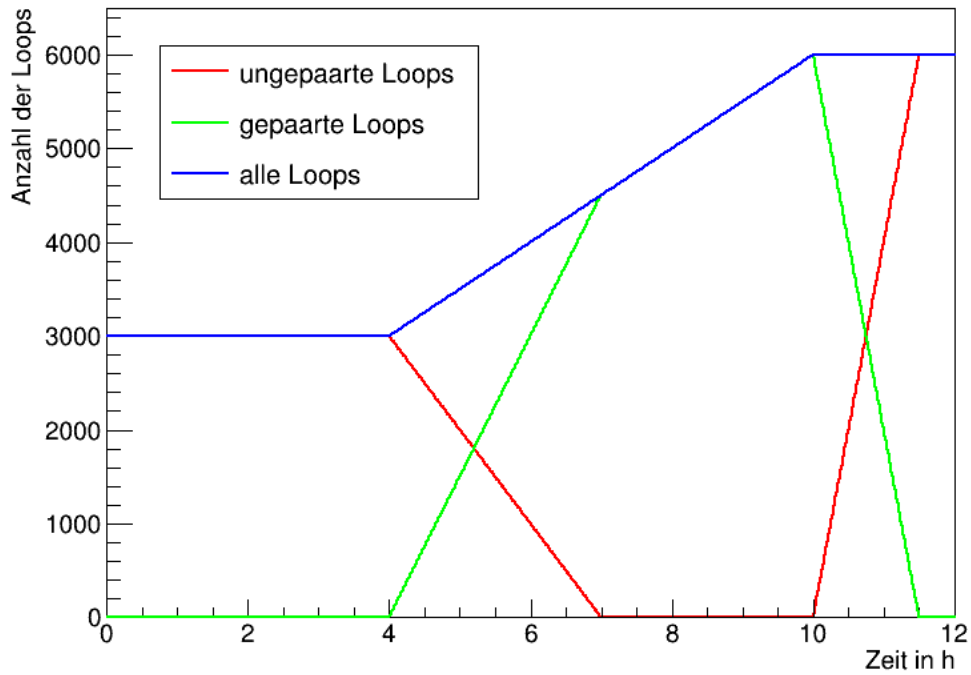


Abbildung 7: Anzahl der gepaarten, ungepaarten und gesamten Chromatin-Loops während des Zellzyklus von Hamsterzellen im GLOBLE-MS-Modell.

3.1.8 LEM-Vorhersage des Überlebens synchroner Zellen nach Ionenbestrahlung

Zur Berechnung des Überlebens synchroner Zellen nach Ionenbestrahlung wird zunächst das Überleben ideal synchronisierter Zellen mit LEM [14], [15] berechnet. Dafür werden aus den GLOBLE-Parametern der entsprechenden Zelllinie die α -, β - und D_t -Parameter (Kap. 3.1.9) der jeweiligen Zellzyklusphase bestimmt. Die in LEM verwendeten Induktionsraten für DSB und SSB gelten für diploide Zellen. Im Laufe des Zellzyklus vergrößert sich der DNA-Gehalt. Entsprechend müssen die DNA-Schadensinduktionsraten mit dem relativen DNA-Gehalt f zu diploiden Zelle skaliert werden. Der Skalierungsfaktor ergibt sich aus der Anzahl der Chromatin-Loops $N_L(\tau)$ (Kap. 2.3.2) zum Zeitpunkt τ nach Mitose und der Anzahl der Chromatin-Loops zu Beginn des Zellzyklus $f = N_L(t)/N_L(0)$. In Verbindung mit der Zunahme des DNA-Gehaltes wird eine Vergrößerung des Zellkernvolumens proportional zum DNA-Gehalt angenommen. Dabei wird davon ausgegangen, dass die Proportionen des Zellkerns konstant bleiben. Der Zellkernradius skaliert mit der dritten Wurzel aus f . Da im LEM das Volumen und der Radius des Zellkerns vorgegeben wird, ergibt sich die Höhe $h = V/(\pi r^2)$ aus der zylindrischen Geometrie des Zellkerns. Die Veränderung der Schadensinduktionsraten, des DNA-Gehalts und der Zellkerngröße ist in Tabelle 1 zusammengefasst. Aus den Überlebenskurven ideal synchronisierter Zellen werden nun anschließend die Überlebenskurven der betrachteten Population, entsprechend Gleichung 33, berechnet. Für asynchrone Zellen wird die Population wie durch Gleichung 32 beschrieben angenommen und für synchrone Zellen wird die Population wie in Kapitel 3.1.1 beschrieben parametrisiert. Anders als in LEM-Publikationen [14], [15] wird in dieser Arbeit eine Genomlänge von 6 Gbp und eine Domänenlänge von $0.55 \mu\text{m}$ (an-

Größe	Formel	Numerischer Wert zum Zeitpunkt 0
DSB Induktionsrate	$y_{DSB} = y_{DSB,0} \cdot f$	$y_{DSB,0} = 30 \text{ DSB/Gy}$
SSB Induktionsrate	$y_{SSB} = y_{SSB,0} \cdot f$	$y_{SSB,0} = 1250 \text{ SSB/Gy}$
Genomlänge	$GL = GL_0 \cdot f$	$GL_0 = 6 \text{ Gbp}$
Volumen	$V = V_0 \cdot f$	$V_0 = 500 \mu\text{m}^3$
Radius	$r = r_0 \cdot f^{1/3}$	$r_0 = 5 \mu\text{m}$

Tabelle 1: LEM-Parameter in Abhängigkeit des relativen DNA-Gehalts f .

stelle von 5.4 Gbp und $0.54 \mu\text{m}$) verwendet, damit die Genomlänge und Anzahl der Chromatin-Loops konsistent zu den Werten im GLOBLE-Modell sind.

3.1.9 Transformation vom GLOBLE- zum LQ- und LQL-Modell

Die Beschreibung des zellzyklusspezifischen Überlebens durch das GLOBLE-Modell muss in LQL-Parameter transformiert werden, damit es als Input für das LEM genutzt werden kann. Dafür werden im ersten Schritt die LQ-Parameter bestimmt und im zweiten die Übergangsdosis D_t .

Bestimmung der LQ-Parameter

Zur Bestimmung der LQ-Parameter wird die Beziehung zwischen dem GLOBLE- und den LQ-Parametern aus den Gleichungen 18 und 19 erweitert. Es wird die mathematische Tatsache ausgenutzt, dass sich das zellzyklusspezifische GLOBLE-Modell perfekt synchronisierter Zellen in das zellzyklusunabhängige GLOBLE-Modell überführen lässt. Damit lassen sich die GLOBLE-Parameter der Überlebenskurve zur Zeit nach Mitose τ , in die LQ-Parameter α und β durch

$$\alpha_{DSB} = y_{DSB} \cdot N_L(\tau) / N_L(0) \quad (36)$$

$$\alpha = \left(\epsilon_{i,1} \cdot \frac{N_1(\tau)}{N_L(\tau)} + \epsilon_{i,2} \cdot \frac{N_2(\tau)}{N_L(\tau)} \right) \cdot \alpha_{DSB} \quad (37)$$

$$\beta = \frac{\epsilon_c}{2} \cdot \left(\frac{\alpha_{DSB}^2}{N_L(\tau)} - \frac{\alpha \cdot \alpha_{DSB}}{N_L(\tau)} \right) \quad (38)$$

mit der DSB-Induktionsrate y_{DSB} , der Gesamtanzahl der Chromatin-Loops $N_L(\tau)$, der Anzahl der Chromatin-Loops des diploiden Chromosomensatzes $N_L(0)$, der Anzahl der ungepaarten- und gepaarten Chromatin-Loops $N_1(\tau)$ und $N_2(\tau)$ und den GLOBLE-Parametern $\epsilon_{i,1}, \epsilon_{i,2}, \epsilon_c$, berechnen. Diese Relation ist jedoch nur für ideal synchronisierte Zellen möglich.

Wenn LQ-Parameter von Überlebenskurven nicht perfekt synchronisierter Zellen durch das GLOBLE-Modell vorhergesagt werden sollen, so geschieht das über eine Kurvenanpassung. Dabei wird das LQ-Modell an die GLOBLE-Modellvorhersage angepasst.

Bestimmung der Übergangsdosis

Für asynchrone Zellen nach Photonenbestrahlung wird das D_t durch Gleichung 8 abgeschätzt. Diese Abschätzung schlägt für synchrone Zellen fehl, da vor allem während der S-Phase das α/β -Verhältnis der

Zellüberlebenskurven sehr klein ist, wodurch sich unrealistisch kleine D_t ergeben. Im Folgenden werden zwei heuristische Methoden zur Bestimmung der Übergangsdosis vorgestellt, welche dann später anhand von Daten evaluiert werden.

Im GLOBLE-Modell ergibt sich die Resistenz der Zellen in S-Phase gegenüber Photonenstrahlung aus der besseren Reparaturfähigkeit der iDSB durch die HR. Mit steigender Dosis vergrößert sich der cDSB-Anteil, sodass die HR keinen Vorteil für die Reparatur mehr bietet. Der cDSB-Beitrag dominiert schließlich den Effekt. Das hat zur Folge, dass die Steigungen der Dosiseffektkurve bei hohen Dosen proportional zur Anzahl der cDSB und damit proportional zum DNA-Gehalt sind. Zellen in der G1-Phase haben den niedrigsten DNA-Gehalt und sind damit am resistantesten gegenüber Hochdosisbestrahlung. Entsprechend dominieren diese das Überleben asynchroner Populationen. Daraus folgt, dass die maximale Steigung des LQL-Modells s_{\max} die Steigung der Zellen in G1-Phase ist. Zusammengefasst bedeutet dies: 1. die maximale Steigung der Dosiseffektkurve der Zellen in G1-Phase ist gleich der maximalen Steigung asynchroner Zellen und 2. die maximale Steigung der Dosiseffektkurve für Zellen in späteren Zellzyklusphasen ist proportional zum DNA-Gehalt $f(\tau)$, relativ zu den Zellen in der G1-Phase. Die Steigung wird mit

$$s_{\max}(\tau) = s_{\max,a} \cdot f(\tau) \quad (39)$$

aus der maximalen Steigung asynchroner Zellen $s_{\max,a}$ und dem relativen DNA-Gehalt Faktor f (s. o.) berechnet. Damit ist die maximale Steigung der Überlebenskurven der relevante Parameter. Die Übergangsdosis D_t wird als Hilfsmittel benutzt um diese einzustellen.

Die maximale Steigung der Dosiseffektkurve asynchroner Zellen wird aus Daten bestimmt. Dafür wird das LQ-Modell an Überlebenskurven asynchroner Zellen angepasst. Aus den α, β -Parametern wird die Übergangsdosis D_t nach Gleichung 8 bestimmt. Aus Gleichung 7 ergibt sich schließlich die maximale Steigung $s_{\max,a}$. Darauf folgend wird die Steigung $s_{\max}(\tau)$ für die einzelnen Zellzyklusphasen berechnet und damit auch die Übergangsdosis D_t . Diese Methode zur Bestimmung der Übergangsdosis D_t wird im Folgenden als Extrapolation-A bezeichnet.

Als alternativer Ansatz kann die maximale Steigung s_{\max} aus dem GLOBLE-scale-Modell (Kap. 3.1.7) abgeleitet werden. Da beim GLOBLE-scale-Modell der Effekt proportional zur relativen Anzahl der Schäden ist, hängt die s_{\max} nicht vom DNA-Gehalt der Zelle ab. Es gilt

$$s_{\max}(\tau) = s_{\max,a} = \text{konst.} \quad (40)$$

Die Steigung der Dosiseffektkurve $s_{\max,a}$, einer entsprechenden asynchronen Zellpopulation wird mit Gleichung 8 und den α, β -Parametern bestimmt. Diese Näherung wird im Folgenden als Extrapolation-B bezeichnet.

Für beide Methoden wird zusätzlich zu den Überlebenskurven synchroner Zellen eine Überlebenskurve asynchroner Zellen benötigt.

An dieser Stelle hat keine der beiden Extrapolationen einen Vorzug gegenüber der anderen, da beide konsistent mit Zellüberlebenskurven nach Photonenbestrahlung sind. Zunächst werden beide für die Vorhersagen im LEM verwendet, um später zu evaluieren, welche die Daten besser beschreibt.

3.2 Zellexperimente

Die Experimente mit Zellen wurden im Zusammenhang von Sylvie Lerchls Praktikums- [90] und Masterarbeit [91] durchgeführt. Hier soll nur ein Überblick über die verwendeten Methoden gegeben werden, eine detailliertere Ausführung ist den Refs. [90], [91] zu entnehmen.

Das Ziel dieser Versuche ist es, das Überleben synchroner und asynchroner Zellen für einen breiten Dosisbereich (0-30 Gy) zu messen. Die Versuche werden mit chinesischen Hamstereierstockzellen (engl.: *Chinese Hamster Ovary*, CHO) durchgeführt. Bei der durchflusszytometrischen Messung (Kap. 3.2.1) und den Überlebensassay (Kap. 3.2.3) handelt es sich um Standardmethoden der Zellbiologie. Bei der Synchronisation von Zellen durch Kontaktinhibition (Kap. 3.2.2) wird ein bereits bekanntes Verfahren angewendet, die konkrete Anwendung für CHO-Zellen wurde allerdings im Zusammenhang der Experimente etabliert. Der *Multiwell Control Probability Assay* (MCP-Assay) (Kap. 3.2.4) wurde in Anlehnung an die TCP etabliert, um Zellüberleben bei hohen Dosen zu messen.

3.2.1 Durchflusszytometrische Messung der Zellzyklusverteilung

Die Zellzyklusverteilung wird durchflusszytometrisch bestimmt. Dabei wird ein Strom einer Zellsuspension hydrodynamisch fokussiert. Dadurch wird erreicht, dass Zellen jeweils einzeln eine Messkammer passieren. Zur Messung des DNA-Gehalts werden die Zellen mit dem DNA-Farbstoff 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) gefärbt und während der Messung mit einer Quecksilberdampflampe und einem Laser angeregt. Die Fluoreszenzintensität des DNA-Farbstoffs DAPI ist proportional zum DNA-Gehalt im Zellkern [92]. Die so gemessene Häufigkeitsverteilung zeigt einen Peak für Zellen in G1-Phase und einen weiteren Peak bei doppelter Intensität, in Bezug auf den ersten Peak, für Zellen der G2- und M-Phase. Zellen in S-Phase haben eine kontinuierliche Verteilung in dieser Darstellung, welche sich zwischen den Peaks der Zellen in G1- und G2-/M-Phase befindet. Eine Analyse des DAPI-Intensitätshistogramm, mit der Methode von Watson et al. [93], ergibt die prozentualen Anteile der Zellen in G1-, S- und G2-/M-Phase.

3.2.2 Synchronisation von CHO-Zellen durch Kontaktinhibition

Für die Synchronisation von Zellen wird die Kontaktinhibition ausgenutzt. Dafür werden CHO-Zellen mit zehnmal höheren Dichte als bei normaler Passage ausgesät. Diese werden anschließend inkubiert, bis sie konfluent und dadurch kontaktinhibiert sind. Die anfänglich höhere Zellzahl soll eine Verkürzung der Inkubationszeit bewirken. Durch diese Prozedur ergibt sich eine Akkumulation von Zellen in der G1-Phase. Nach der Synchronisation werden die Zellen in der für die Experimente benötigten Weise ausgesät. Nach anschließender 4-stündiger Inkubation sind die Zellen angehaftet und befinden sich noch in G1-Phase, sodass sie für Versuche genutzt werden können. Eine 13-stündige Inkubation nach Aussaat bewirkt, dass die Zellen sich anheften und die meisten Zellen die späte S-Phase erreicht haben.

Die Zellzyklusverteilung als Funktion der Zeit nach Synchronisation ist in Abbildung 8 dargestellt. Die Bestimmung der Populationsparameter (Kap. 3.1.1) ergab die Werte $\sigma = 2.4 \pm 0.2$ h und $t_0 = 5.21 \pm 0.17$ h.

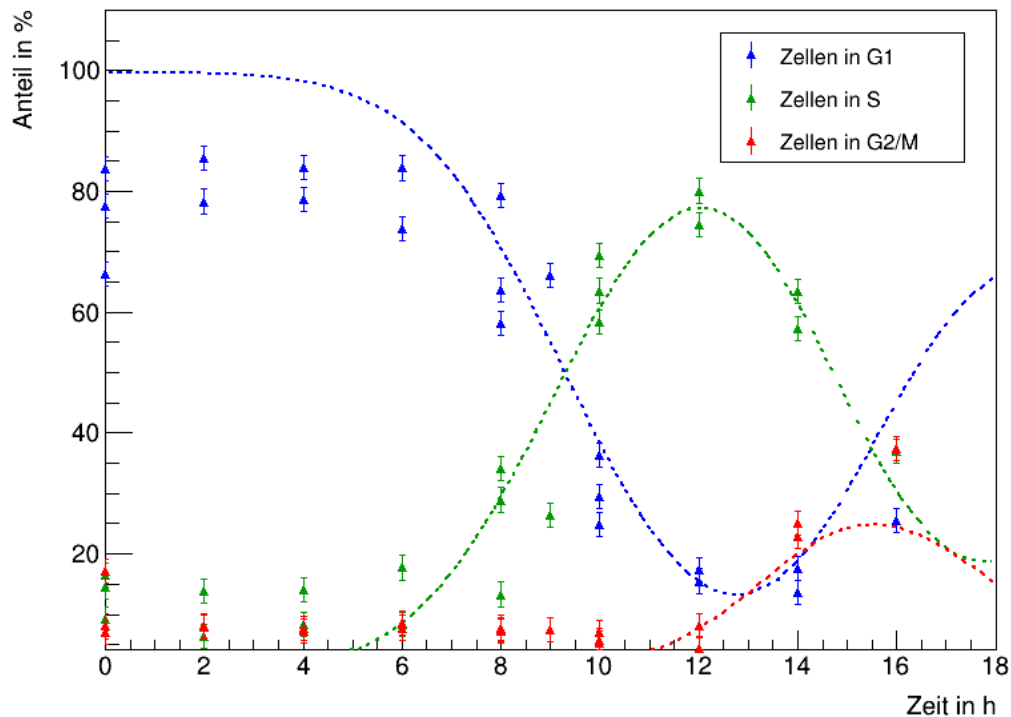


Abbildung 8: Zellzykluskinetik kontaktinhibierter CHO-Zellen nach der Wiederaussaat. Daten aus Ref. [91].

3.2.3 Klonogener Überlebensassay

Zur Messung des Überlebens asynchroner Zellen durch das klonogene Überlebensassay werden die Zellen 24h vor der Bestrahlung ausgesät. Für Versuche mit synchronen Zellen werden diese gemäß des oben beschriebenen Protokolls (Kap. 3.2.2) vorbereitet. Die Bestrahlung erfolgte durch 250 kVp-Röntgenstrahlung. Anschließend werden die Zellen dreimal pro Probe ausgesät. Die Zellkonzentration bei der Aussaat wird so gewählt, dass die erwartete Anzahl der überlebenden Zellen 100 beträgt. Die Zellen werden 7 Tage unter Standardbedingungen inkubiert. Anschließend werden sie mit Methylblau gefärbt. Danach wird die Anzahl der gebildeten Kolonien bestimmt, indem alle Kolonien gezählt werden die mindestens 50 Zellen enthalten [63]. Die gemessene Überlebenswahrscheinlichkeit wird schließlich aus der mittleren Kolonienzahl und der Anzahl der ursprünglich ausgesäten Zellen berechnet. Bei den so gewonnenen Daten handelt es sich zunächst um Wertepaare aus Dosis D und dem Produkt aus Überleben S und Plattiereffizienz PE , also $S \cdot PE$. Die PE wird wie in Kapitel 3.1.3 beschrieben bestimmt.

3.2.4 Der MCP-Assay

Zur Messung des Zellüberlebens bei hohen Dosen ($\gtrsim 10$ Gy) ist das klonogene Überlebensassay nur bedingt geeignet. Deshalb wurde im Rahmen von Sylvie Lerchls Masterarbeit [91] das MCP-Assay etabliert. Dafür werden M CHO-Zellen in N Kulturbehälter ausgesät, bestrahlt und eine Woche lang inkubiert [91]. Anschließend wird gezählt, in wie vielen Kulturbehältern sich Kolonien mit mindestens 50 Zellen gebildet haben. Das MCP gibt die Wahrscheinlichkeit an, dass ein Behälter keine Kolonien enthält. Entsprechend gilt dann $MCP = p = k/N$ mit k Kulturbehälter, die keine Kolonien enthalten, von

insgesamt N Behältern. Der Zusammenhang zum Überleben einzelner Zellen S ergibt sich durch die Poisson-Wahrscheinlichkeit aus

$$MCP = \exp[-M \cdot S] \quad (41)$$

bei M bestrahlten Zellen. Zur Vorhersage des MCP aus den Messungen des klonogenen Überlebens (Kap. 3.2.3), wird das Zellüberleben S des zu untersuchenden Modells (LQ oder GLOBLE) inter- bzw. extrapoliert und in Gleichung 41 eingesetzt.

Abschätzung der Unsicherheiten des MCP

Bei dem MCP handelt es sich um eine binomialverteilte Größe. Für die Abschätzung der Unsicherheit wird das Wilson-Intervall [94] verwendet, das laut einem Vergleich verschiedener Abschätzungsverfahren eine angemessene Methode darstellt [95]. Das Wilson-Intervall dient der Abschätzung des Konfidenzintervalls entsprechend dem Irrtumsniveau von c Standard-Intervallen. Die obere und untere Grenze der Wahrscheinlichkeit wird durch

$$p_{o,u} = \frac{1}{1 + \frac{c^2}{N}} \cdot \left(p + \frac{c^2}{2N} \pm c \cdot \sqrt{\frac{p \cdot (1-p)}{N} + \frac{c^2}{4N^2}} \right) \quad (42)$$

mit der Wahrscheinlichkeit p , für k von N kontrollierter Wells. Für die Bestimmung des Konfidenzintervalls des gleichen Irrtumsniveaus eines Standard-Intervalls wird c im Folgenden zu eins gesetzt.

Empirische Beschreibung des Datenverlaufs

Die MCP-Kurve folgt einer sigmoiden Form. Zur empirischen Verdeutlichung des Datenverlaufs werden diese durch

$$MCP(D) = \frac{1}{1 + e^{-(b_0 + b_1 \cdot D)}} \quad (43)$$

mit der Dosis D und den freien Parametern b_0 und b_1 beschrieben. Die Dosis des Wendepunkts (D_{50}) wird durch $D_{50} = -b_0/b_1$ berechnet. Die Unsicherheit der D_{50} ($\sigma_{D_{50}}$) wird mithilfe der Gauß'schen Fehlerfortpflanzung durch

$$\sigma_{D_{50}} = \sqrt{\left(-\frac{1}{b_1}\right)^2 \cdot \sigma_{b_0}^2 + \left(-\frac{b_0}{b_1^2}\right)^2 \cdot \sigma_{b_1}^2 + 2 \cdot \left(-\frac{1}{b_1}\right) \left(-\frac{b_0}{b_1^2}\right) \cdot \rho \cdot \sigma_{b_0} \cdot \sigma_{b_1}}, \quad (44)$$

aus $\sigma_{b_0}, \sigma_{b_1}$, den Unsicherheiten der b_0, b_1 Parameter und deren Korrelation ρ berechnet.

Berechnung des klonogenen Überlebens

Für eine Veranschaulichung der Ergebnisse werden die Daten des MCP- und klonogenen Überlebensassay in einer Gesamtübersicht als Überleben dargestellt. Zur Berechnung des Zellüberlebens aus dem MCP wird die Gleichung 41 nach S aufgelöst. Zur Berechnung der Unsicherheiten wird die obere und

untere Grenze des Standardintervalls für das MCP durch Gleichung 42 berechnet und entsprechend in S umgerechnet. Das resultierende Standardintervall des Zellüberlebens wird als Fehlerbalken dargestellt. MCP-Datenpunkte, die ein MCP von 1 oder 0 aufweisen, werden bei dieser Umrechnung weggelassen, da dies zu einer Überlebenswahrscheinlichkeit von 0 bzw. 1 führt, wodurch der Gesamteindruck der Daten verfälscht würde.

3.2.5 Anpassung des LQL-Modells an Daten des klonogenen- und MCP-Assay

Für die Anpassung von Überlebenskurven mit dem Parametersatz $\vec{\alpha}$ an Datensätze, die sowohl Messungen des klonogenen Überlebens als auch des MCP enthalten, wird eine Maximum-Likelihood-Methode verwendet. Dadurch wird berücksichtigt, dass die Daten dieser zwei Methoden unterschiedlich verteilt sind. Einzelne Datenpunkte des klonogenen Überlebensassays unterliegen einer Gaußverteilung. Jedem Datenpunkt wird der folgende Likelihood-Term zugewiesen

$$\mathcal{L}_{Gauss}(\vec{\alpha}) = \frac{1}{\sqrt{2\pi\sigma^2}} \cdot \exp\left(-\frac{(x-\mu)^2}{2\sigma^2}\right) \quad (45)$$

mit $\mu = -\ln(S_{obs})$, dem gemessenen Überleben S_{obs} bei der Dosis D und dem Überleben der anzupassenden Funktion S in Form von $x = -\ln(S(D))$. Die Datenpunkte des MCP-Assays sind binomialverteilt, deren Likelihood-Term ist

$$\mathcal{L}_{binom}(\vec{\alpha}) = \binom{n}{k} p^k (1-p)^{n-k} \quad (46)$$

für k Gefäße ohne Kolonien von insgesamt n Kulturgefäßen und $p = \exp[-M \cdot S(D)]$ mit der Zellzahl M und dem gleichen $S(D)$ wie in Gleichung 45. Für eine Anpassung wird eine gemeinsame Likelihood-Funktion $\mathcal{L}_{ges}(\vec{\alpha}) = \prod_i \mathcal{L}_i(\vec{\alpha})$ gebildet, die aus dem Produkt aller beitragenden Terme $\mathcal{L}_i(\vec{\alpha})$ besteht, welche in dem Datensatz enthalten sind. Bei der anschließenden Anpassung wird der beste Schätzer $\hat{\alpha}$ bestimmt. Es werden die Parameterwerte $\vec{\alpha}$ ermittelt, bei denen der Ausdruck $-\ln(\mathcal{L}_{ges}(\vec{\alpha}))$ minimal ist. Zur Bestimmung der Unsicherheiten wird angenommen, dass die Wahrscheinlichkeitsdichten der Parameter gaußverteilt sind. Für die in dieser Arbeit betrachteten Fälle ist das eine gute Näherung (Daten nicht gezeigt). Dafür werden sukzessiv eindimensionale Projektionen des $\mathcal{L}_{ges}(\vec{\alpha})$ betrachtet. Alle Parameter, bis auf α_i , werden mit dem besten Schätzer gleichgesetzt. Die resultierende Funktion $\mathcal{L}_{ges}(\hat{\alpha}, \alpha_i)$ entspricht nun der Wahrscheinlichkeitsdichte des α_i . An diese wird nun die Gauß-Wahrscheinlichkeitsdichte angepasst. Die angepasste Standardabweichung σ wird schließlich als Schätzwert der Unsicherheit verwendet.

3.3 Amorphe Bahnstruktur und DNA-Schadensclustering auf der nm-Skala

Die folgenden Methoden wurden in dieser Arbeit entwickelt, um die Beschreibung der mikroskopischen Dosisdeposition durch die amorphe Bahnstruktur zu untersuchen. Zuerst wird eine Parametrisierung der amorphen Bahnstruktur vorgestellt, die es erlaubt, Vorhersagen in LEM mit unterschiedlichen Anteilen des direkten- und indirekten Effekts zu treffen. Basierend darauf wird eine Monte-Carlo-Simulation vorgestellt, die es erlaubt DNA-Schadenscluster auf der nm-Skala mithilfe der amorphen Bahnstruktur zu

simulieren. Es wird die Definition der DNA-Schadenscluster auf der nm-Skala gemäß den Arbeiten von Nikjoo et al. [25], [35], [36] verwendet.

3.3.1 Beiträge des direkten und indirekten Effekts

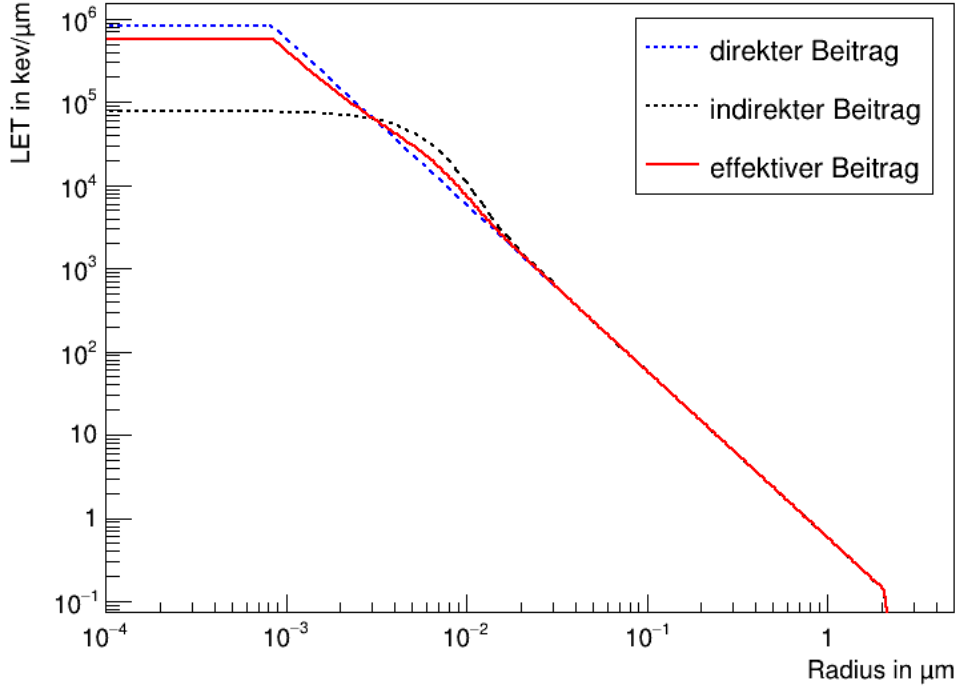


Abbildung 9: Amorphen Bahnstruktur eines Kohlenstoffions der Energie 8 MeV/u. Zu sehen ist der ausschließlich direkte Beitrag der Dosisdeposition ($\theta = 1$), der ausschließlich indirekte Beitrag durch eine vollständig verbreiterten Dosisverteilung ($\theta = 0$) und der effektive Beitrag, bestehend aus einer Mischung von 2/3 direktem und 1/3 indirektem Effekt ($\theta = 2/3$).

In LEM wird die radiale Dosisverteilung von Ionenspuren durch eine vollständige Verschmierung der physikalischen Dosis durch Radikaldiffusion (Gl. 21) angenähert.

In dieser Arbeit soll untersucht werden, ob eine Aufspaltung des direkten und indirekten Effekts zu einer besseren Beschreibung der Dosis führt. Dafür wird eine Parametrisierung eingeführt, die es erlaubt, die Dosis aus einer Mischung des direkten und indirekten Effekts zu beschreiben. Die radiale Dosisverteilung $D_{ges}(r)$ wird mit

$$D_{ges}(r) = \theta \cdot D_{direkt}(r) + (1 - \theta) \cdot D_{indirekt}(r) \quad (47)$$

aus der Dosisverteilung des direkten Effekts $D_{direkt}(r)$ (Gl. 20), des indirekten Effekts $D_{indirekt}(r)$ (Gl. 21) und dem direkten Anteil θ (θ -Wert) berechnet. Bei dem Term des direkten Effekts handelt es sich um die physikalisch deponierte Dosis, die zu DNA-Schäden führt. Der indirekte Term stellt hingegen eine virtuelle Dosis dar. Diese wird durch Radikale vermittelt, welche durch die physikalische Dosis erzeugt werden, anschließend diffundieren und damit die Schadensverteilung verbreitern. Damit ist die Dosis D_{ges} als Schadensdichte zu interpretieren, aus der die DNA-Schadensverteilung bestimmt werden kann.

Für die Untersuchungen werden die θ -Werte von 0, 1/3, 2/3 und 1 verwendet. Die Extrema 0 und 1 stellen einen 100 prozentigen Anteil des indirekten bzw. direkten Effekts dar. Die Werte 1/3 und 2/3 sollen widerspiegeln, dass experimentell ein direkter Anteil von ca. 1/3 nach Photonenbestrahlung beobachtet wurde [38] und maximal 2/3 nach Ionenstrahlung [39].

3.3.2 Simulation von DNA-Schadensclustern auf der nm-Skala mithilfe der amorphen Bahnstruktur

Die amorphe Bahnstruktur und *ab initio* Modelle verfolgen unterschiedliche Ansätze zur Beschreibung der mikroskopischen Dosisdeposition von Ionenspuren. Ein Modellvergleich soll zeigen, inwieweit die Vorhersagen beider Ansätze vereinbar sind. Dafür werden Induktionsraten von DNA-Schadensclustern auf der nm-Skala miteinander verglichen. Im ersten Schritt werden DNA-Schadensinduktionsraten der homogenen Photonenstrahlung simuliert. Im zweiten Schritt werden die Induktionsraten von Ionenstrahlung anhand von der lokalen Dosis der amorphen Bahnstruktur und der Induktionsraten der Photonenstrahlung berechnet.

Die DNA-Schadensclusterinduktionsraten der Photonenstrahlung werden mit einer Monte-Carlo-Simulation vorhergesagt. Dabei werden einzelne SSB und DSB auf einer virtuellen DNA verteilt. Diese haben Induktionsraten von 1250 SSB pro Gy und 30 DSB pro Gy. Die SSB werden durch einen einzelnen Strangbruch an einer zufälligen Position und einem zufällig ausgewählten Strang realisiert. Für die DSB werden zwei genau gegenüberliegende Strangbrüche auf einer zufälligen Position der DNA induziert. Anschließend wird die DNA in Fragmente der Länge 54 bp, entsprechend Ref. [36], unterteilt und anhand der Schadensklassifizierung ausgewertet. Die verwendete Genomlänge G_L beträgt 6 Gbp. Zur Reduktion der Rechenzeit wird bei hohen Dosen die Genomgröße und die Schadensinduktionsraten mit einem Faktor f , analog zu Ref. [81], multipliziert. Der Faktor f wird durch

$$f = \frac{10}{D \cdot y_{DSB}} \quad (48)$$

mit der Dosis D berechnet. Der maximal erlaubte Wert wird auf $f_{max} = 1/10$ und der minimal erlaubte auf $f_{min} = 54 \text{ bp} \cdot 1000/6 \text{ Gbp}$ eingegrenzt. Diese Rechnung wird im Dosisbereich von 10 bis $2 \cdot 10^7$ Gy, in 10 äquidistanten Schritten pro Dekade, auf einer logarithmischen Skala durchgeführt.

Zur Bestimmung der Induktionsrate nach Ionenbestrahlung werden die Schadensinduktionsraten nach Photonenbestrahlung mit der radialen Dosisverteilung eines einzelnen Teilchens ausgewertet. Um die Beiträge des direkten- und indirekten Effekts zu berücksichtigen, wird die Dosisverteilung aus Gleichung 47 (Kap. 3.3.1) verwendet. Die Induktionsrate einer DNA-Schadensklasse y_{ion} wird durch

$$y_{ion} = \frac{\int dr y_{\gamma}(D(r)) \cdot D(r)}{\int dr D(r)} \quad (49)$$

mit der Induktionsrate der entsprechenden Schadensklasse nach Photonenbestrahlung y_{γ} und der radialen Dosisverteilung $D(r)$ berechnet.



4 Modellierung des Zellüberlebens

Das Ziel dieses Kapitels ist es, das GLOBLE-Modell und das LEM in einen konsistenten Modellrahmen zu bringen. Dafür werden Methoden etabliert, mit dem es möglich ist, GLOBLE-Vorhersagen von Dosiseffektkurven nach Photonenbestrahlung zu Ionenbestrahlung zu extrapolieren. Dies erlaubt es, den Einfluss des Zellzyklus und den der Reparaturdefizite für niedrig- und hoch-LET-Strahlung zu untersuchen. Damit soll geprüft werden, inwieweit sich die beiden Modelle miteinander vereinen lassen und welche neuen Möglichkeiten sowie Limitierungen sich daraus ergeben. Dafür wird zunächst das Überleben nach Photonenbestrahlung anhand des GLOBLE-Modells für synchrone und reparaturdefiziente Zellen untersucht. Darauf aufbauend wird das LEM angewendet, um das Überleben synchroner Zellen nach Ionenbestrahlung und asynchrone Zellen mit Reparaturdefiziten vorherzusagen.

4.1 Ergebnisse

In diesem Kapitel werden GLOBLE-Modellvorhersagen synchroner, asynchroner, reparaturkompetenter und reparaturdefizienter Zellen mit Daten verglichen. Anschließend werden theoretische Überlegungen und Experimente zur Bestimmung des Zellüberlebens nach hohen Dosen Photonenstrahlung vorgestellt. Schließlich werden LEM-Vorhersagen des Überlebens synchroner und asynchroner, reparaturdefizienter Zellen mit Daten verglichen. Die zentrale Frage dabei ist, ob das LEM in der Lage ist, die durch das GLOBLE-Modell beschriebenen Effekte nach Photonenbestrahlung auch für Ionenstrahlung korrekt vorherzusagen.

4.1.1 Modellierung des Überlebens synchroner Zellen nach Photonenbestrahlung

Es werden Datensätze untersucht, die von Wilma Kraft-Weyrather [64] erhoben wurden, eine Auflistung befindet sich in Tabelle 2. Diese Datensätze enthalten Überlebenskurven asynchroner und synchroner Zellen. Die Methoden der Kultivierung, Bestrahlung [96] und Synchronisation [97], [98] der Zellen wurden anderweitig veröffentlicht. Zunächst wird das GLOBLE-Modell an die Überlebensdaten synchroner CHO- und V79-Zellen angepasst.

Versuch	Zelllinie	Zellzyklus Zustand	t_0 in h	σ in h
V79-x1	V79	synchron	0.41 ± 0.22	2.14 ± 0.22
V79-x2	V79	synchron	-2.00 ± 0.20	1.96 ± 0.22
V79-x3	V79	synchron	-1.32 ± 0.37	2.92 ± 0.28
V79-a	V79	asynchron	—	—
CHO-x1	CHO	synchron	-3.45 ± 0.37	3.05 ± 0.30
CHO-a	CHO	asynchron	—	—

Tabelle 2: Untersuchte Datensätze synchroner und asynchroner Zellen, mit Zelllinie, Zellzykluskonditionen sowie den Populationsparametern t_0 und σ . Parametrisierung der synchronen Population erfolgt entsprechend Kapitel 3.1.1. Daten aus Ref. [64].

Zur Aufbereitung der experimentellen Daten wird im ersten Schritt die Synchronisationsqualität zur Charakterisierung der Zellpopulationen bestimmt. Aus einer Anpassung der Zellzykluskinetiken werden die Populationsparameter t_0 und σ bestimmt (Kap. 3.1.1) und in Tabelle 2 angegeben. Die Populationsparameter der einzelnen Versuche mit synchronen Zellen unterscheiden sich deutlich voneinander. Deshalb

muss jeder Versuch zunächst einzeln betrachtet werden. Zur Veranschaulichung der Zellzykluskinetiken sind die Anteile der Zellen in G1-, S- und G2/M-Phase als Funktion der Zeit in den Abbildungen 10a-d (unterer Graph) dargestellt.

		GLOBLE	GLOBLE-MS	GLOBLE-scale
CHO synchron	$\epsilon_{i,1}$	0.0099 ± 0.0004	0.0094 ± 0.0004	0.0081 ± 0.0004
	$\epsilon_{i,2}$	0.0000 ± 0.0001	0.0007 ± 0.0005	0.0025 ± 0.0007
	ϵ_c	0.108 ± 0.006	0.130 ± 0.010	0.163 ± 0.012
CHO asynchron	$\epsilon_{i,1}$	0.0092 ± 0.0011	—	—
	$\epsilon_{i,2}$	0	—	—
	ϵ_c	0.133 ± 0.015	—	—
V79 synchron	$\epsilon_{i,1}$	0.0064 ± 0.0006	0.0060 ± 0.0006	0.0040 ± 0.0017
	$\epsilon_{i,2}$	0.0000 ± 0.0000	0.0000 ± 0.0000	0.0022 ± 0.0014
	ϵ_c	0.126 ± 0.010	0.144 ± 0.009	0.194 ± 0.039
V79 asynchron	$\epsilon_{i,1}$	0.0034 ± 0.0012	—	—
	$\epsilon_{i,2}$	0	—	—
	ϵ_c	0.16 ± 0.02	—	—

Tabelle 3: Parameter des GLOBLE-, GLOBLE-MS- und GLOBLE-scale-Modells aus der Anpassung synchroner und asynchroner Überlebenskurven. Für die Versuche mit der V79-Zelllinie sind jeweils die Mittelwerte angegeben.

Die Anpassung der Modelle erfolgt, indem das GLOBLE-, GLOBLE-MS- und GLOBLE-scale-Modell, unter Zuhilfenahme der Populationsparameter, simultan an alle Überlebenskurven eines Versuchs mit synchronen Zellen angepasst werden. Als Beispiel einer Anpassung des GLOBLE-Modells sind die Daten des Versuchs V79x2 und die angepassten Überlebenskurven in Abbildung 11 dargestellt. Die angepassten Letalitäten der einzelnen GLOBLE-Varianten sind in Tabelle 3 aufgelistet.

Im Folgenden werden Überlebenskurven synchroner Zellen als Funktion der Zeit, bei einer konstanten Dosis von 2 Gy (Kap. 3.1.5), betrachtet. Für die Darstellung der Daten wird das LQ-Modell an alle Überlebenskurven dieses Datensatzes angepasst, die resultierenden Parameter sind in Tabelle 4 aufgelistet. Die Datenpunkte werden in den folgenden Darstellungen mithilfe dieser Parameter und des LQ-Modells berechnet. Die Anpassungen der GLOBLE-, GLOBLE-MS- und GLOBLE-scale-Modelle an Überlebenskurven sind mit den Daten für CHO-Zellen in Abbildung 10a und für V79-Zellen in den Abbildungen 10b-d dargestellt. Die GLOBLE-Modellanpassung beschreibt den zeitlichen Datenverlauf für CHO-Zellen innerhalb der Unsicherheiten. Für V79-Zellen wird das Überleben während der S-Phase unterschätzt. Die Daten zeigen das höchste Überleben der mittleren S-Phase, während das GLOBLE-Modell dies in der späten S-Phase vorhersagt. Die GLOBLE-MS-Anpassung zeigt während der S-Phase in allen vier Datensätzen ein höheres Überleben als das GLOBLE-Modell. Damit beschreibt das GLOBLE-MS-Modell die Überlebensdaten der V79-Zellen besser. Die Vorhersagen der zwei GLOBLE-Modellvarianten unterscheiden sich darin, dass die GLOBLE-MS-Modellanpassung das höchste Überleben in der mittleren S-Phase zeigt, während die GLOBLE-Modellanpassung dies in der späten S-Phase vorhersagt.

Die GLOBLE-scale-Modellanpassung zeigt das Maximum der Resistenz am Ende der S-Phase. Damit beschreibt es die Daten der CHO-Zellen ähnlich gut wie die GLOBLE-Modellanpassung. Die GLOBLE-scale-Modellanpassung zeigt eine schlechte Beschreibung der Überlebensdaten der V79-Zellen. Es wird

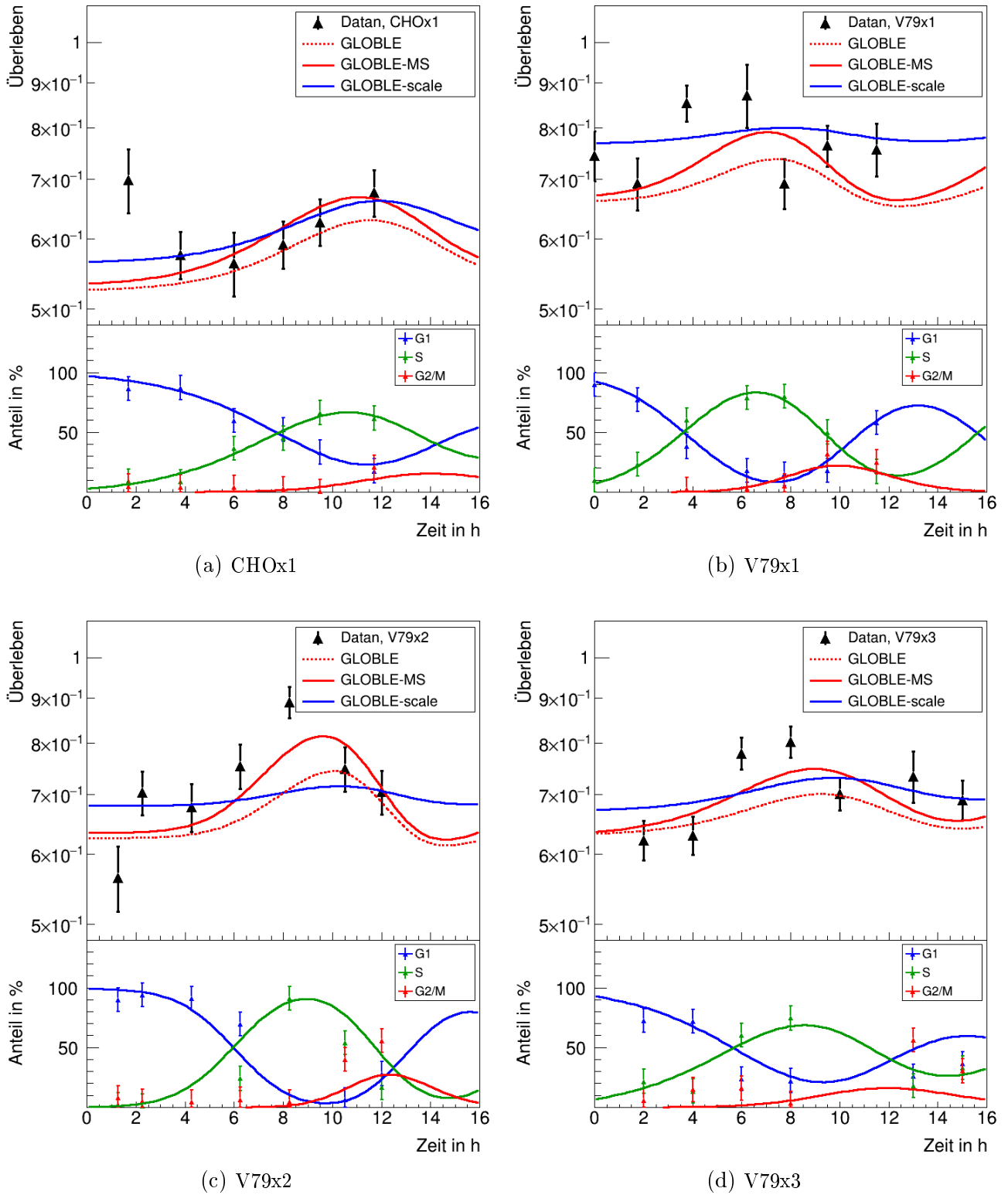


Abbildung 10: oberer graph: Daten des zellzyklusspezifische Überleben nach 2 Gy Photonenbestrahlung als Funktion der Zeit nach Synchronisation mit den GLOBLE-, GLOBLE-MS- und GLOBLE-scale-Modellanpassung. Datenpunkte werden mithilfe des LQ-Modells (Parameter in Tab. 4) bestimmt. Unterer Graph: die zugehörigen Zellzyklusverteilung. Die Primärdaten stammen aus Ref. [64].

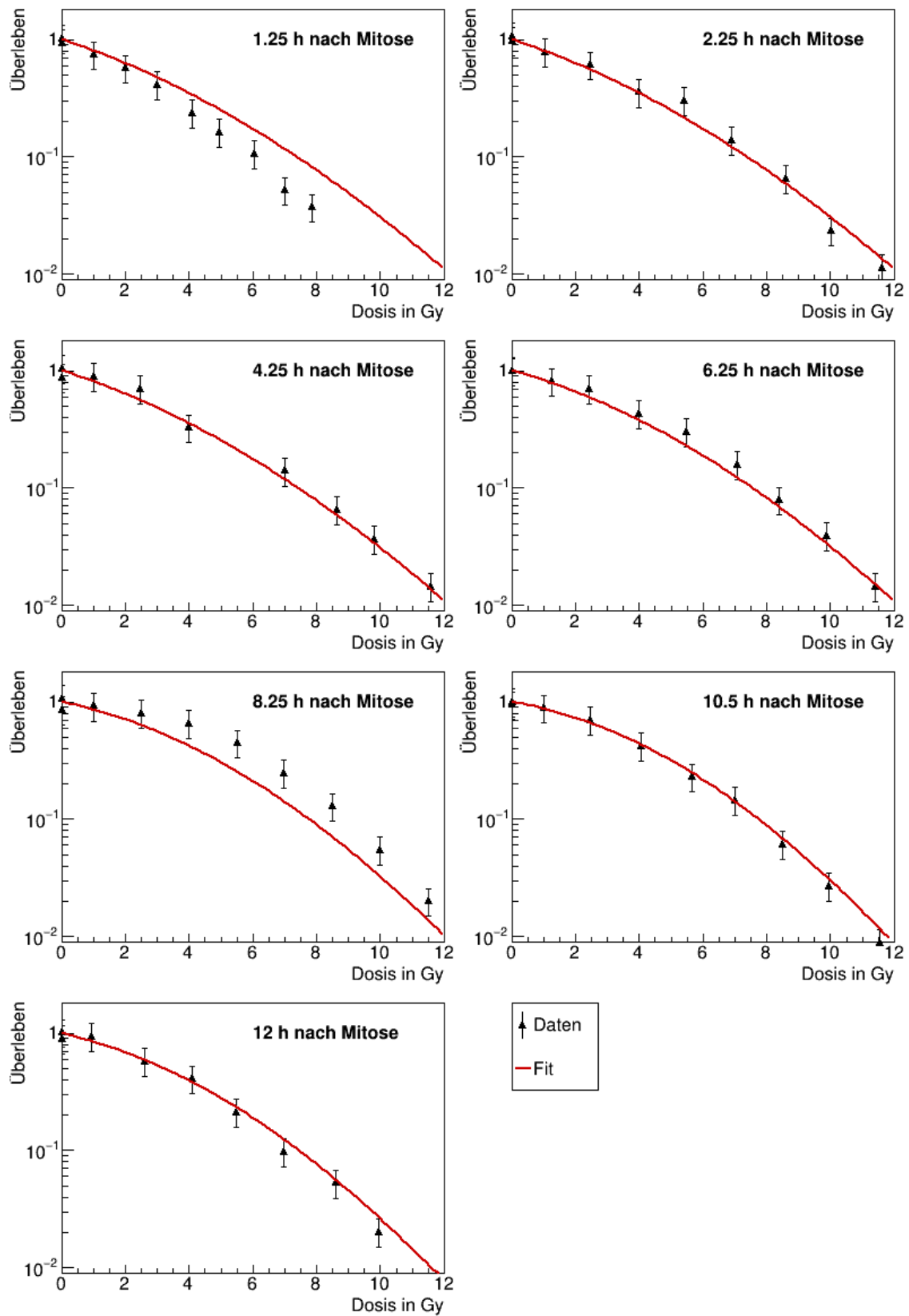


Abbildung 11: Simultane Anpassung des GLOBLE-Modells an synchrone Überlebenskurven des Versuchs V79x2. Aufgetragen sind jeweils die Daten der Überlebenskurven zu verschiedenen Zeiten nach Synchronisation und die zugehörige GLOBLE-Anpassung.

CHOx1			
t in h	α in Gy ⁻¹	β in Gy ⁻²	α/β in Gy
1.70	0.09 ± 0.04	0.047 ± 0.006	1.84
3.80	0.24 ± 0.03	0.017 ± 0.004	14.21
6.00	0.25 ± 0.04	0.020 ± 0.006	12.56
8.00	0.23 ± 0.03	0.016 ± 0.004	14.65
9.50	0.19 ± 0.03	0.020 ± 0.004	9.81
11.70	0.15 ± 0.03	0.020 ± 0.004	7.63
CHOa			
—	0.23 ± 0.03	0.020 ± 0.005	11.5
V79x1			
t in h	α in Gy ⁻¹	β in Gy ⁻²	α/β in Gy
0.00	0.09 ± 0.03	0.027 ± 0.004	3.36
1.75	0.14 ± 0.03	0.023 ± 0.004	5.89
3.75	0.00 ± 0.02	0.0404 ± 0.0009	0.00
6.20	0.00 ± 0.04	0.0343 ± 0.0009	0.00
7.75	0.14 ± 0.03	0.021 ± 0.004	6.62
9.50	0.07 ± 0.03	0.034 ± 0.003	1.96
11.50	0.07 ± 0.04	0.036 ± 0.004	1.83
V79x2			
t in h	α in Gy ⁻¹	β in Gy ⁻²	α/β in Gy
1.25	0.24 ± 0.04	0.024 ± 0.006	10.15
2.25	0.13 ± 0.03	0.02 ± 0.003	5.83
4.25	0.16 ± 0.03	0.018 ± 0.003	8.88
6.25	0.09 ± 0.03	0.024 ± 0.003	3.86
8.25	0.00 ± 0.02	0.0329 ± 0.0008	0.00
10.50	0.09 ± 0.03	0.028 ± 0.003	3.25
12.00	0.12 ± 0.03	0.027 ± 0.003	4.34
V79x3			
t in h	α in Gy ⁻¹	β in Gy ⁻²	α/β in Gy
2.00	0.20 ± 0.03	0.018 ± 0.003	11.37
4.00	0.20 ± 0.02	0.015 ± 0.003	13.72
6.00	0.06 ± 0.02	0.034 ± 0.002	1.65
8.00	0.050 ± 0.019	0.029 ± 0.002	1.74
10.00	0.13 ± 0.02	0.021 ± 0.003	6.27
13.00	0.09 ± 0.03	0.034 ± 0.004	2.58
15.00	0.14 ± 0.03	0.022 ± 0.003	6.59
V79a			
—	0.097 ± 0.02	0.022 ± 0.002	4.41

Tabelle 4: LQ-Parameter zu den Überlebensdaten aus den Versuchen in Tabelle 2.

lediglich das mittlere Überleben während des Zellzyklus korrekt wiedergegeben, aber nicht der zeitliche Verlauf. Die Ab- und Zunahmen des Überlebens während des Zellzyklus ist nur schemenhaft erkennbar. Nun wird untersucht, ob es möglich ist, das Überleben asynchroner Zellen aus der GLOBLE-Modellanpassung des Überlebens synchroner Zellen vorherzusagen. Die GLOBLE-Vorhersage wird dann mit der Anpassung an das Überleben asynchroner Zellen verglichen. Die Parameter beider Anpassungen sind in Tabelle 3 aufgelistet. Ein Vergleich der Überlebenskurven asynchroner Zellen mit dem LQ- und GLOBLE-Modell ist für CHO-Zellen in Abbildung 12a und für V79-Zellen in Abbildung 12b dargestellt. Die GLOBLE-Vorhersage zeigt für die Daten der CHO-Zellen eine Übereinstimmung innerhalb der Fehlerbalken. Im Falle der V79-Zellen unterschätzt die GLOBLE-Vorhersage das Zellüberleben; die GLOBLE-Vorhersage ist gegenüber der LQ-Kurve um eine Dosis von ca. 0.5 Gy zu niedrigeren Dosen verschoben. Diese Vorhersage streift jeweils das untere Ende der Fehlerbalken und ist damit in Einklang mit den Daten. Aus diesen Ergebnissen wird gefolgert, dass das GLOBLE-Modell das Überleben asynchroner Zellen aus dem Überleben synchroner Zellen voraussagen kann.

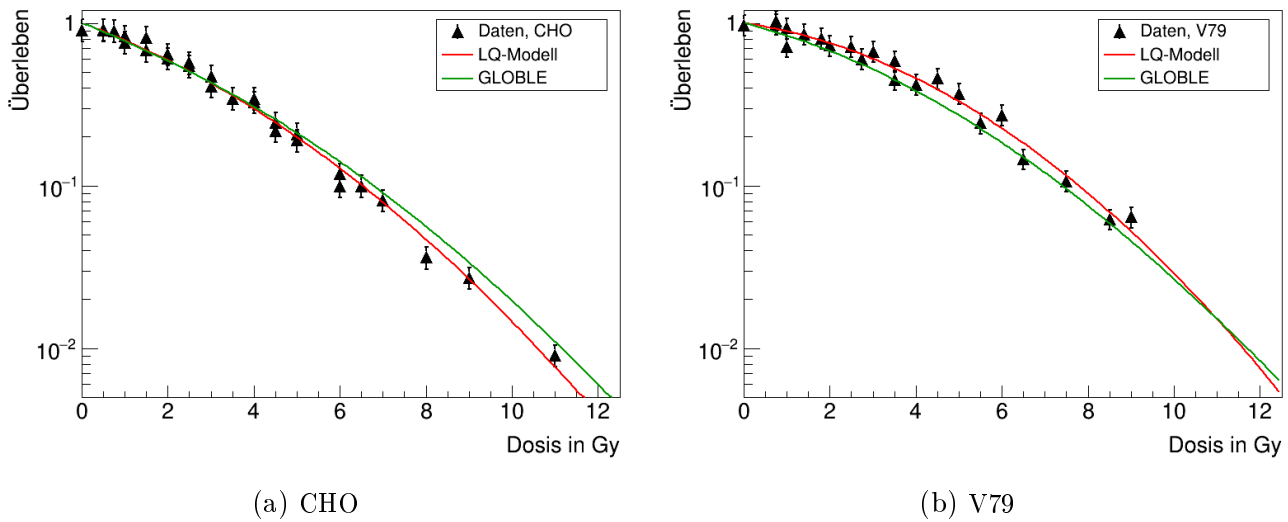


Abbildung 12: Überlebenskurven von asynchronen CHO-Zellen in a und V79-Zelllinie in b aus Ref. [64]. Die LQ-Kurve wird an die Daten angepasst, die GLOBLE-Vorhersage wird mit den Parametern der Anpassung an synchrone Zellen vorhergesagt.

Als nächstes wird die umgekehrte Vorgehensweise, d. h. die Berechnung des Überlebens synchroner Zellen aus dem Überleben asynchroner Zellen, betrachtet. Für einen besseren Vergleich der Daten untereinander, werden diese als Funktion der Zeit nach Mitose τ in Abbildung 13a für CHO- und Abbildung 13b für V79-Zellen zusammengefasst. Dadurch werden interexperimentellen Unterschiede in der Wiederaufnahme des Zellzyklus nach Synchronisation kompensiert. Die Unterschiede in der Synchronisationsqualität bleiben bestehen. Es werden die GLOBLE-Modellanpassungen an Daten synchroner Zellen und die GLOBLE-Vorhersage aus der Anpassung an das Überleben asynchroner Zellen für CHO-Zellen in Abbildung 13a und für V79-Zellen in Abbildung 13b dargestellt. Für CHO-Zellen ist eine gute Übereinstimmung beider Methoden sichtbar. Für V79-Zellen ist eine deutliche Abweichung zwischen beiden Varianten des GLOBLE-Modells zu sehen. Die Vorhersage aus asynchronen Zellen zeigt im Mittel ein höheres Überleben als die direkte Anpassung an synchrone Zellen. Außerdem sagt die Anpassung eine stärkere Veränderung des Überlebens voraus, welche besser zu den Daten passt. Beide Varianten zeigen das höchste Überleben in der späten S-Phase, während die Daten dies in der mittleren S-Phase zeigen.

Aus diesen Ergebnissen wird geschlossen, dass das Überleben synchroner Zellen aus dem Überleben asynchroner Zellen vorhergesagt werden kann. Die Genauigkeit der Vorhersage ist aber auch zelllinien-spezifisch. Die Vorhersagen geben im Wesentlichen die systematische Eigenschaften des zeitlichen Verlauf des Überlebens wieder. Dadurch ist eine qualitative Beschreibung möglich. Eine genaue quantitative Beschreibung ist jedoch nicht immer möglich.

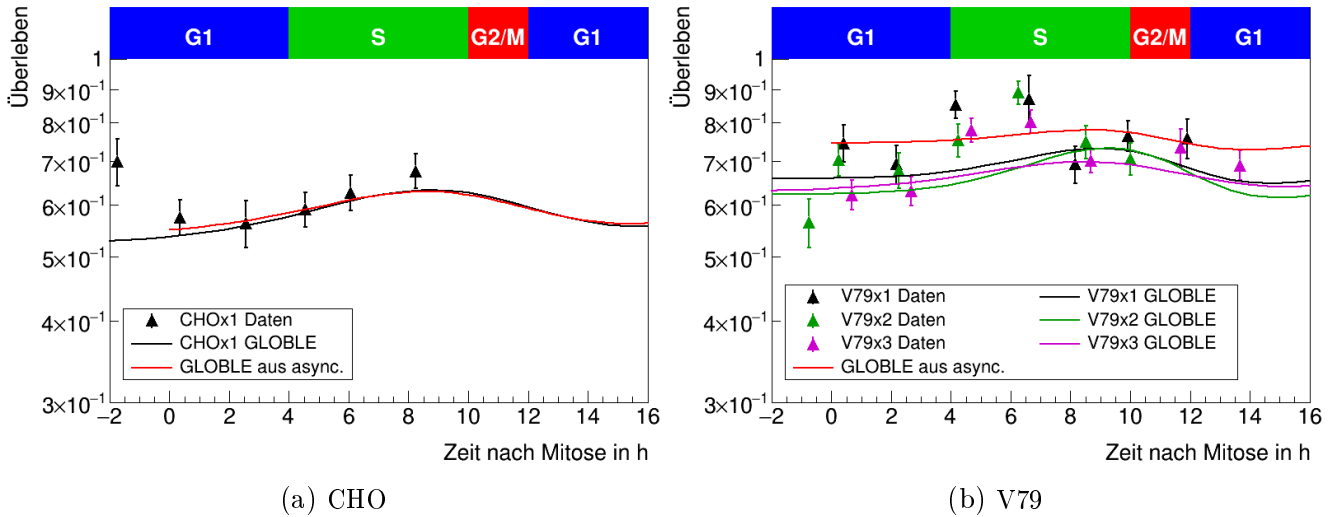
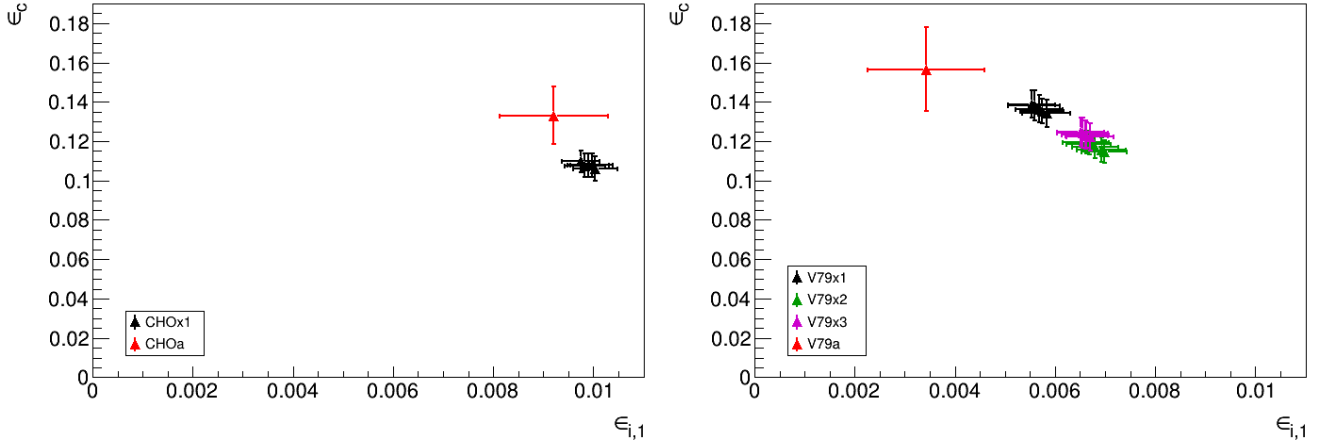


Abbildung 13: Zusammenfassung des Überlebens nach 2 Gy Photonenstrahlung (aus Fig. 10), als Funktion der Zeit nach Mitose. Experimente der CHO-Zelllinie in a und V79-Zelllinie in b. Die Datenpunkte werden mit Hilfe des LQ-Modells und den Parametern in Tabelle 4 bestimmt. Die GLOBLE-Vorhersagen werden an die einzelnen Experimente mit synchronen Zellen angepasst. Zusätzlich wird die Vorhersage des zellzyklusspezifischen Überlebens durch das GLOBLE-Modell, basierend auf dem Überleben asynchroner Zellen, eingezeichnet.

Systematische Unsicherheiten der Zellzykluskinetiken, welche sich aus der verwendeten Parametrisierung ergeben, werden durch eine Variation der Populationsparameter um eine Standardabweichung abgeschätzt. Der Einfluss dieser Unsicherheiten auf die GLOBLE-Modellanpassung wird ausgewertet, indem die GLOBLE-Modellanpassung mit jeder Variation wiederholt wird. Die so gewonnenen GLOBLE-Parameter $\epsilon_{i,1}$ und ϵ_c werden in einer zweidimensionalen Auftragung für CHO-Zellen in Abbildung 14a und für V79-Zellen in Abbildung 14b dargestellt. Der Einfluss der Variationen ist exemplarisch für den Versuch V79x2 in Abbildung 15a dargestellt. Aus dieser Auftragung wird ersichtlich, dass die interexperimentelle Variation die Unsicherheiten dominiert. An zweiter Stelle kommen die statistischen Unsicherheiten der Anpassung. Den kleinsten Einfluss haben die Unsicherheiten der Populationsparameter. Im Folgenden werden jeweils nur die größten Unsicherheiten berücksichtigt: für V79-Zellen die interexperimentelle Variation und für CHO-Zellen die Unsicherheiten der Anpassung, da nur die Daten eines Experiments vorliegen. Die GLOBLE-Parameter der Anpassung an das Überleben asynchroner Zellen werden ebenfalls in den Abbildungen 14a und 14b dargestellt. Die Anpassung der Parameter an Überlebenskurven synchroner und asynchroner Zellen zeigt eine Übereinstimmung der Letalitäten für CHO-Zellen. Für V79-Zellen sieht man eine Abweichung von ca. 2.4 Standardintervalle für $\epsilon_{i,1}$ und 1.5 für ϵ_c zwischen den beiden Methoden.

Schließlich werden die Unsicherheiten der GLOBLE-Vorhersage des Überlebens synchroner Zellen bestimmt, welche aus den Unsicherheiten der Populations- und GLOBLE-Parameter resultieren. Dafür



(a) CHO

(b) V79

Abbildung 14: Darstellung der GLOBLE-Parameter ($\epsilon_{i,1}, \epsilon_c$) als zweidimensionaler Graph zur Abschätzung der Unsicherheiten für CHO-Zellen in a und V79-Zellen in b. Die Parameter der einzelnen Versuche werden mit der gleichen Farbe dargestellt (CHOx1 schwarz in a; V79x1 schwarz, V79x2 Magenta und V79x3 grün in b), wobei für jeden Versuch die Populationsparameter um je eine Standardabweichung variiert und die GLOBLE-Parameter neu angepasst werden. Die Fehlerbalken ergeben sich aus der Anpassung der Parameter und spiegeln damit die statistische Unsicherheit des Überlebens wider. Ebenfalls sind die Letalitäten aus der Anpassung des GLOBLE-Modells an asynchrone Überlebenskurven dargestellt (rote Datenpunkte).

werden Vorhersagen des Überlebens für alle oben beschriebenen Variationen der Parameter durchgeführt. Jede dieser GLOBLE-Vorhersagen wird als Funktion der Zeit nach Synchronisation und einer Dosis von 2 Gy für den Versuch V79x2 in Abbildung 15b dargestellt. Daraus geht hervor, dass die systematischen Unsicherheiten der Anpassung bzw. Vorhersage durch das GLOBLE-Modell in etwa halb so groß wie die statistischen Unsicherheiten der Datenpunkte sind.

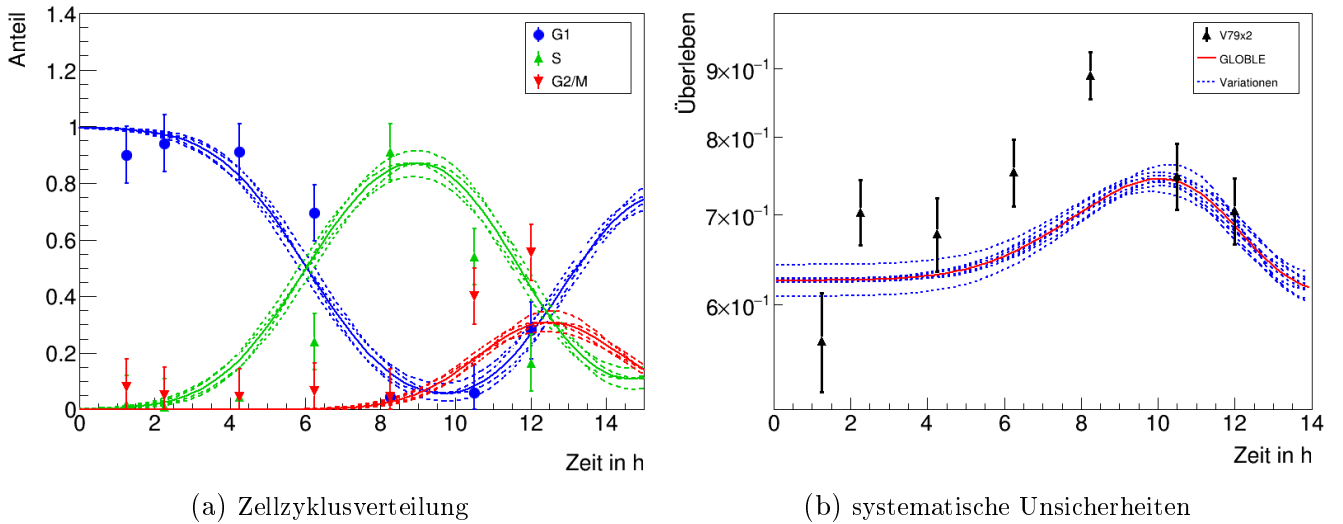


Abbildung 15: Abschätzung der systematischen Unsicherheiten der Beschreibung des Überlebens synchroner Zellen. Abbildung a zeigt die Anpassung der Zellzykluskinetiken an den Versuch V79x2 (durchgezogene Linien) sowie die Vorhersagen nach einer Variation der Parameter (σ oder t_0) um jeweils eine Standardabweichung (gestrichelte Linien). Abbildung b zeigt Daten des Überlebens synchroner Zellen nach 2 Gy Photonenstrahlung (Versuch V79x2), die GLOBLE-Modellvorhersage und die GLOBLE-Modellvorhersagen nach Variation der zugrunde liegenden GLOBLE- und Populationsparameter ($\epsilon_{i,1}$, $\epsilon_{i,2}$, ϵ_c , σ und t_0).

4.1.2 Modellierung des Überlebens reparaturdefizienter Zellen

Als nächstes wird untersucht, ob die von Hufnagl et al. [4] publizierte GLOBLE-Vorhersage des Überlebens synchroner reparaturdefizienter Zellen geeignet ist, das Überleben asynchroner reparaturdefizienter Zellen vorherzusagen. Dafür wird der oben hergestellte Zusammenhang zwischen dem Überleben synchroner und asynchroner Zellen ausgenutzt.

In diesem Kapitel werden die Daten von Takahashi et al. [99] betrachtet. Dabei handelt es sich um Überlebenskurven von embryonischen Mausfibroblasten (engl. *Mouse Embryonic Fibroblasts*, MEF), die homozygot defizient im Tumor-Suppressorprotein p53 ($p53^{-/-}$) sind sowie drei Mutanten davon mit Defizienten in DNA-Reparaturproteinen. Im Folgenden werden p53 defiziente MEF-Zellen als Wildtyp-Zellen (wt-Zellen) bezeichnet. Zellen die zusätzlich ein Defizit der Ligase 4, einem Protein des NHEJ-Reparaturweges, aufweisen, werden als Lig4-KO abgekürzt. Zellen die einen rad54-Defizit aufweisen, einem Protein des HR-Reparaturweges, werden als rad54-KO abgekürzt. Die Variante mit Defekten in Ligase 4 und rad54 wird als double-KO bezeichnet.

Das GLOBLE-Modell wird simultan an die Überlebenskurven der vier Zelllinien angepasst. Für diese Anpassung werden die Längen der Zellzyklusphasen benötigt, welche jedoch nicht in der Publikation angegeben sind. Es ist nicht möglich andere Angaben in der Literatur zu finden, da sich MEF-Zellen je nach Präparation in ihrem Phänotyp unterscheiden [100]. Als Standard wird die gleiche Länge des Zellzyklus wie bei CHO-Zellen ($T = 12$ h; $T_{G1} = 4$ h, $T_S = 6$ h, $T_{G2M} = 2$ h) angenommen. Die angepassten Überlebenskurven sind in Abbildung 16a dargestellt. Die Größenordnung der Einflüsse von Reparaturdefekten auf das Zellüberleben wird reproduziert. Während die Vorhersage einzelne Punkte sehr gut beschreibt, weichen die Vorhersagen bei anderen um den Faktor 2-3 ab. Das Überleben der wt-Zellen wird unter-

schätzt, das der Rad54-KO-Zellen überschätzt. Die ersten zwei Datenpunkte der Lig4-KO-Zellen werden gut beschreiben, der dritte wird überschätzt. Für die double-KO-Zellen zeigt die Modellvorhersage eine gute Übereinstimmung mit den Daten.

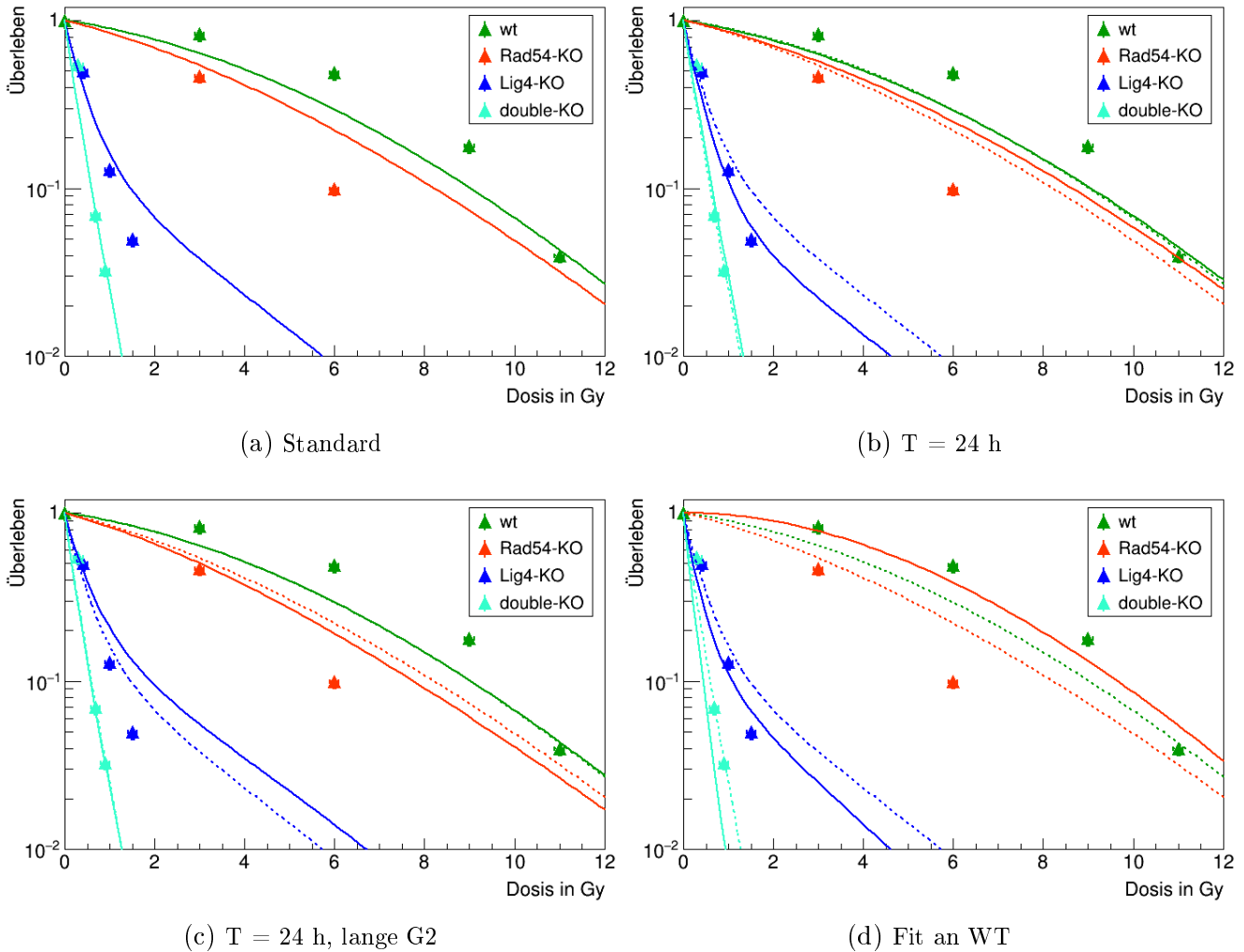


Abbildung 16: Überlebenskurven von asynchronen wt-Zellen sowie die Mutanten Lig4-KO, Rad54-KO und double-KO, nach Photonenbestrahlung (Daten aus Ref. [99]). Abbildung a zeigt das simultan angepasste GLOBLE-Modell an die vier Überlebenskurven angepasst, dies stellt die Standardsituation dar. Abbildungen b und c zeigen die Anpassungen mit alternativen Zellzykluskinetik (durchgezogene Linien) und als Vergleich den Normalfall aus Abbildung a (gestrichelte Linien). Abbildung d zeigt die Anpassung des GLOBLE-Modells an die Überlebenskurve der wt-Zellen und die damit vorhergesagten Überlebenskurven der reparaturdefizienten Zellen.

Um die Sensitivität der Vorhersagen auf unterschiedliche Verdopplungszeiten zu untersuchen, werden die Anpassungen mit unterschiedlichen Längen der Zellzyklusphasen wiederholt. Als Beispiel einer Verdopplungszeit von 24 h werden die Zellzyklusphasen von HeLa-Zellen⁴ angenommen ($T_{G1} = 14\text{h}$, $T_S = 8\text{h}$, $T_{G2M} = 2\text{h}$). Die angepassten Kurven dafür sind in Abbildung 16b dargestellt. Zusätzlich wird eine Periodendauer von ebenfalls 24 h, aber mit einer verlängerten G2- und einer kurzen G1-Phase ($T_{G1} = 4\text{h}$, $T_S = 8\text{h}$, $T_{G2M} = 12\text{h}$) angenommen (Abb. 16c). Dies spiegelt eine Akkumulation von Zellen in G2-Phase wider, für die es bei reparaturdefizienten MEF-Zellen Hinweise gibt [101]. Aus den Abbil-

⁴ menschliche Zellen eines Gebärmutterhalskrebs

dungen 16a-c geht hervor, dass die genauen Längen der Zellzyklusphasen einen geringen Einfluss auf die Vorhersage des Überlebens von wt- und double-KO-Zellen haben. Für rad54-KO- und Lig4-KO-Zellen ist eine Verschiebung von 0.5-1 Gy der Überlebenskurve gegenüber dem Standard sichtbar.

Nun wird untersucht, ob die gleiche Beschreibung der Daten alleine aus der Überlebenskurve der wt-Zellen möglich ist. Dafür wird eine GLOBLE-Modellanpassung an die Überlebenskurve der wt-Zellen durchgeführt. Die anderen Überlebenskurven werden aus den angepassten Parametern vorhergesagt und sind in Abbildung 16d dargestellt. Das Überleben der wt-Zellen wird durch den Fit leicht verzerrt, bis auf einen Faktor 2 wiedergegeben und damit besser als durch die vorhergehende Anpassungen (Abb. 16d a-c). Das Überleben der Lig4-KO- und double-KO-Zellen wird durch diese Vorhersage ähnlich gut wie durch die Anpassung an alle Daten beschrieben. Die Vorhersage der rad54-KO-Zellen ist deckungsgleich mit der von wt-Zellen und überschätzt somit das Überleben der rad54-KO-Zellen. Insgesamt lässt sich daraus die Größenordnung des Überlebens der Lig4-KO- und double-KO-Zellen vorhersagen, jedoch nicht das der rad54-KO-Zellen.

Analog zu der Anpassung des GLOBLE-Modells wird auch das GLOBLE-MS- (Abb. 17a) und GLOBLE-scale-Modell (Abb. 17b) an die Überlebensdaten angepasst. Es findet eine simultane Anpassung an alle vier Überlebenskurven, mit dem oben genannten Standard-Zellzyklus, statt. Die erhaltenen Parameter sind in Tabelle 5 aufgelistet. Die GLOBLE-MS- und GLOBLE-scale-Anpassung an die wt- und double-KO-Zellüberlebenskurven unterscheidet sich nur marginal von der GLOBLE-Anpassung. Die GLOBLE-MS- und GLOBLE-scale-Anpassung der rad54-KO-Zellüberlebenskurven zeigt bei hohen Dosen ein geringeres Überleben als die GLOBLE-Modellanpassung. Die GLOBLE-MS-Anpassung für die Lig4-KO-Zelllinie überschätzt die Daten und die GLOBLE-Vorhersage ab einer Dosis von 1Gy. Die Unterschiede zum GLOBLE-Modell beruhen zum Teil auf der Vereinfachung bei der Einführung des GLOBLE-Modells. Das GLOBLE-scale-Modell überschätzt ebenfalls das Überleben der Lig4-KO-Zellen, jedoch nicht so stark wie das GLOBLE-MS-Modell. Insgesamt kann man sagen, dass bis auf die Beschreibung der Lig4-KO-Mutanten, das GLOBLE-MS- und GLOBLE-scale-Modell diese Daten ebenso gut beschreiben wie das GLOBLE-Modell.

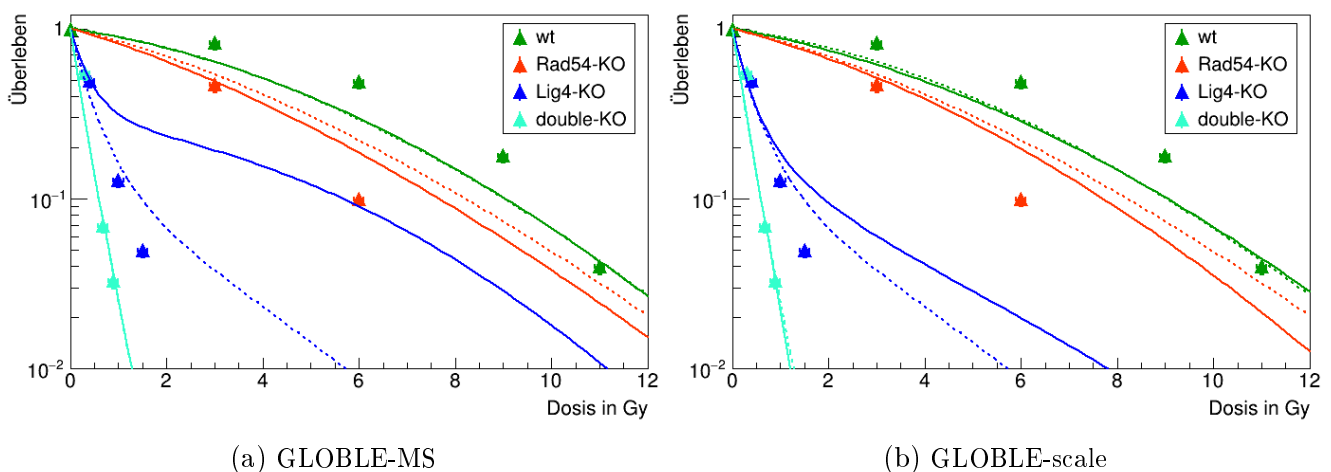


Abbildung 17: Überlebenskurven asynchroner wt-Zellen sowie die Mutanten Lig4-KO, Rad54-KO und double-KO, nach Photonenbestrahlung, Daten aus Ref. [99]. An die Daten werden das GLOBLE-MS (Abb. a) und GLOBLE-scale (Abb. b) angepasst und dargestellt (durchgezogene Linie). Als Vergleich dazu ist die GLOBLE-Modellanpassung aus Abb. 16a (gestrichelte Linien) eingezeichnet.

		wt	Rad54-KO	Lig4-KO	double-KO
GLOBLE	$\epsilon_{i,1}$	0.0038 \pm 0.0013	0.0038 \pm 0.0013	0.105 \pm 0.010	0.105 \pm 0.010
	$\epsilon_{i,2}$	0	0.0038 \pm 0.0013	0	0.105 \pm 0.010
	ϵ_c	0.105 \pm 0.010	0.105 \pm 0.010	0.105 \pm 0.010	0.105 \pm 0.010
GLOBLE-MS	$\epsilon_{i,1}$	0.0047 \pm 0.0024	0.0047 \pm 0.0024	0.104 \pm 0.016	0.104 \pm 0.016
	$\epsilon_{i,2}$	0	0.0047 \pm 0.0024	0	0.104 \pm 0.016
	ϵ_c	0.104 \pm 0.016	0.104 \pm 0.016	0.104 \pm 0.016	0.104 \pm 0.016
GLOBLE-scale	$\epsilon_{i,1}$	0.0057 \pm 0.0019	0.0057 \pm 0.0019	0.128 \pm 0.012	0.128 \pm 0.012
	$\epsilon_{i,2}$	0	0.0057 \pm 0.0019	0	0.128 \pm 0.012
	ϵ_c	0.128 \pm 0.012	0.128 \pm 0.012	0.128 \pm 0.012	0.128 \pm 0.012

Tabelle 5: Parameter des GLOBLE-, GLOBLE-MS-, GLOBLE-scale-Modells, die aus der simultanen Anpassung an Überlebenskurven von vier MEF-Zelllinien mit unterschiedlichen Defiziten der DNA-Reparaturwege resultieren. Innerhalb einer Modellvariante werden jeweils nur die drei gleichen Parameter verwendet. Zur Vorhersage der Überlebenskurven der wt-Zellen wird das GLOBLE-Modell wie üblich angewendet. Für Rad54-KO-Zellen hingegen wird die HR-Defizienz durch Ersetzung des $\epsilon_{i,2}$ -Parameters durch den $\epsilon_{i,1}$ -Parameter ausgedrückt. Im Falle der Lig4-KO-Zellen wird $\epsilon_{i,1}$ durch ϵ_c substituiert und für die double-KO-Zellen werden schließlich alle Parameter gleich dem ϵ_c -Parameter gesetzt. Die gleichen Werte sind jeweils farblich kodiert hervorgehoben.

4.1.3 Extrapolation des Zellüberlebens zur Hochdosisbestrahlung

In den vorigen Kapiteln wird das Überleben synchroner und asynchroner sowie reparaturkompetenter und reparaturdefizienter Zellen nach Photonenstrahlung untersucht. Um daraus das Zellüberleben nach Ionenbestrahlung mit dem LEM vorhersagen zu können, muss zunächst die Vorhersage des Zellüberlebens zu hohen Dosen extrapoliert werden.

Mehrere Arbeiten zeigen, dass Überlebenskurven bei hohen Dosen von einer reinen LQ-Form abweichen [5]–[10]. Dabei kann sich der quadratische Beitrag bis hin zum Übergang in eine rein lineare Form reduzieren. Die Arbeiten von Skarsgard et al. [5], [6] und Hawkins et al. [7] erklären die Abweichung von der reinen LQ-Form der Zellüberlebenskurven durch die heterogenen Radiosensitivitäten der zellzyklusabhängigen Subpopulationen einer asynchronen Zellkultur. Selbst wenn die Überlebenskurven der Subpopulationen dem LQ-Modell folgen, weicht die resultierende Überlebenskurve einer asynchronen Zellkultur von der reinen LQ-Form ab.

Wenn das LQ-Modell zweimal an die Überlebenskurve angepasst wird, einmal bei niedrigen Dosen und einmal bei hohen Dosen, so ist der Wert von α/β für die Anpassung im Niedrigdosisbereich kleiner als Hochdosisbereich. Werden Überlebenskurven durch das LQL-Modell beschrieben, so ist die Übergangsdosis zwischen dem Niedrig- und Hochdosisbereich zelllinienspezifisch und variiert liegt im Bereich ≈ 6.2 -15 Gy (für $\alpha/\beta = 2$ Gy bis $\alpha/\beta = 10$ Gy nach Gl. 8 [74]). Die Arbeiten von Skarsgard et al. und Hawkins et al. beschränken sich darauf, die Gesamtpopulation durch die Summe von zwei Subpopulationen, eine sensitive und eine resistente, zu beschreiben. Mithilfe des GLOBLE-Modells soll nun untersucht werden, wie die Übergangsdosis von den LQ-Parametern α und β abhängt. Es wird eine kontinuierliche Verteilung der Subpopulationen über den Zellzyklus (Gl. 32) angenommen. Dafür werden die GLOBLE-Parameter von synchronen CHO-Zellen aus Kapitel 4.1.1 verwendet. Für jeden Zeitpunkt nach Mitose werden die α - und β -Parameter berechnet (Kap. 3.1.9) und in den Abbildungen 18a und 18a dargestellt. Die Häufigkeitsverteilung des α -Parameters ist in Abbildung 18c, die des β -Parameters in

Abbildung 18d, das α/β -Verhältnis in Abbildung 18e und die zweidimensionale Darstellung der Häufigkeitsverteilung von α, β -Kombinationen in Abbildung 18f dargestellt. Daraus ist ersichtlich, dass sich die α - und β -Parameter stark im Laufe des Zellzyklus ändern. Damit besteht eine asynchrone Zellpopulation aus Subpopulationen, die ein breites Spektrum an α/β -Verhältnissen aufweisen. Dies reicht von 0 Gy bis ca. dem doppelten Wert der asynchronen Population. Der zeitliche Verlauf der α - und β -Parameter (Abb. 18a und 18b) lässt sich ebenfalls in der zweidimensionalen α - β -Verteilung (Abb. 18f) nachverfolgen. Während der G1-Phase ist der α -Parameter konstant, sinkt im Laufe der S-Phase auf null. In der G2/M-Phase steigt der α -Parameter auf den doppelten Wert der G1-Phase an. Der β -Parameter ist während der G1-Phase ebenfalls konstant, steigt während der S-Phase auf etwa den 2.6-fachen Wert der G1-Phase und fällt während der G2/M-Phase auf den zweifachen Wert der G1-Phase. Dieser Verlauf lässt sich mit den zeitlichen Verläufen von gepaarten und ungepaarten Chromatin-Loops sowie den Verfügbarkeiten von Reparaturwegen erklären. Das α/β -Verhältnis ist während der G1-Phase konstant, fällt während der S-Phase von ca. 22 Gy auf null und steigt im Laufe der G2/M-Phase wieder auf den Ausgangswert. Es ist zu beachten, dass der Abfall auf null während der S-Phase 6 h dauert, während der Anstieg auf den Ausgangswert während der G2/M-Phase nur 2 h benötigt. Dadurch sind die Anteile der LQ-Parameter sehr ungleich auf der zeitlichen α/β -Trajektorie verteilt.

Überlebenskurven von Zellen in den einzelnen Zellzyklusphasen sind in Abbildung 19a dargestellt. Die Überlebenskurven von Zellen in der S-Phase zeigen eine ausgeprägte Schulterform gegenüber Photonenbestrahlung. Die Überlebenskurven von Zellen der G1-Phase hingegen zeigen eine schwach ausgeprägte Schulterform. Weiterhin sagt das GLOBLE-Modell vorher, dass Zellen in S-Phase resistent gegenüber niedrigen Dosen Photonenstrahlung sind. Bei hohen Dosen werden diese Zellen jedoch empfindlicher als die Zellen der G1-Phase, da deren Überlebenskurve eine flachere Form hat. Dies trägt für asynchrone Zellen zum Abflachen der Dosiseffektkurve bei hohen Dosen bei.

Nun wird die Form der Dosiseffektkurve einer asynchronen Zellpopulation untersucht. Diese ist in Abbildung 19b und die erste Ableitung nach der Dosis in Abbildung 19c dargestellt. Betrachtet man nun die zweite und dritte Ableitung des Effektes nach der Dosis (Abb. 19d und 19e), sieht man, dass die dritte Ableitung ein klar ausgeprägtes Minimum in der Mitte des Übergangsbereichs aufweist. Die Dosis dieses Minimums liegt im Schnittpunkt der Überlebenskurven des Hoch- und Niedrigdosisbereichs. Man kann diese Dosis also als das Analogon zur Übergangsdosis D_t des LQL-Modells deuten.

Da im LEM angenommen wird, dass die Übergangsdosis D_t und das α/β einen Zusammenhang der Form $D_t = b + m \cdot \alpha/\beta$ aufweist, soll untersucht werden, ob durch das GLOBLE-Modell ein ähnlicher Zusammenhang zwischen den LQ-Parametern und der Übergangsdosis hergestellt werden kann. Dafür wird ein Satz von α, β -Parameterkombinationen verwendet. Die α - und β -Parameterkombinationen werden so gewählt, dass typische α/β -Verhältnisse mit typischen β -Werten abgedeckt werden. Als Referenz für typische α - und β -Werte wird die Datenbank von Friedrich et al. [74] verwendet. Für das α/β -Verhältnis wird das Dosisintervall 2-10 Gy in zehn äquidistanten Schritten gewählt. Für den β -Parameter werden die Werte 0.02; 0.045 und 0.07 Gy⁻² benutzt. Anschließend wird jede Parameterkombination in GLOBLE-Parameter transformiert (Kap. 3.1.1) und das Überleben asynchroner Zellen durch das GLOBLE-Modell vorhergesagt. Aus dem Minimum der dritten Ableitung des Effekts wird die Übergangsdosis D_t bestimmt und als Funktion des α/β -Verhältnisses dargestellt (Abbildung 19f). Eine lineare Anpassung

$(D_t = b + m \cdot \alpha/\beta)$ an die resultierenden Werte zeigt, dass D_t einen nahezu linearen Zusammenhang mit dem α/β -Verhältnis aufweist, mit dem y-Achsenabschnitt $b = 4.3 \text{ Gy}$ und der Steigung $m = 0.63$. Damit wurde zum ersten Mal ein mechanistischer Zusammenhang zwischen der Übergangsdosis und den LQ-Parametern hergestellt, sodass ein Verständnis der zugrundeliegenden Mechanismen möglich ist.

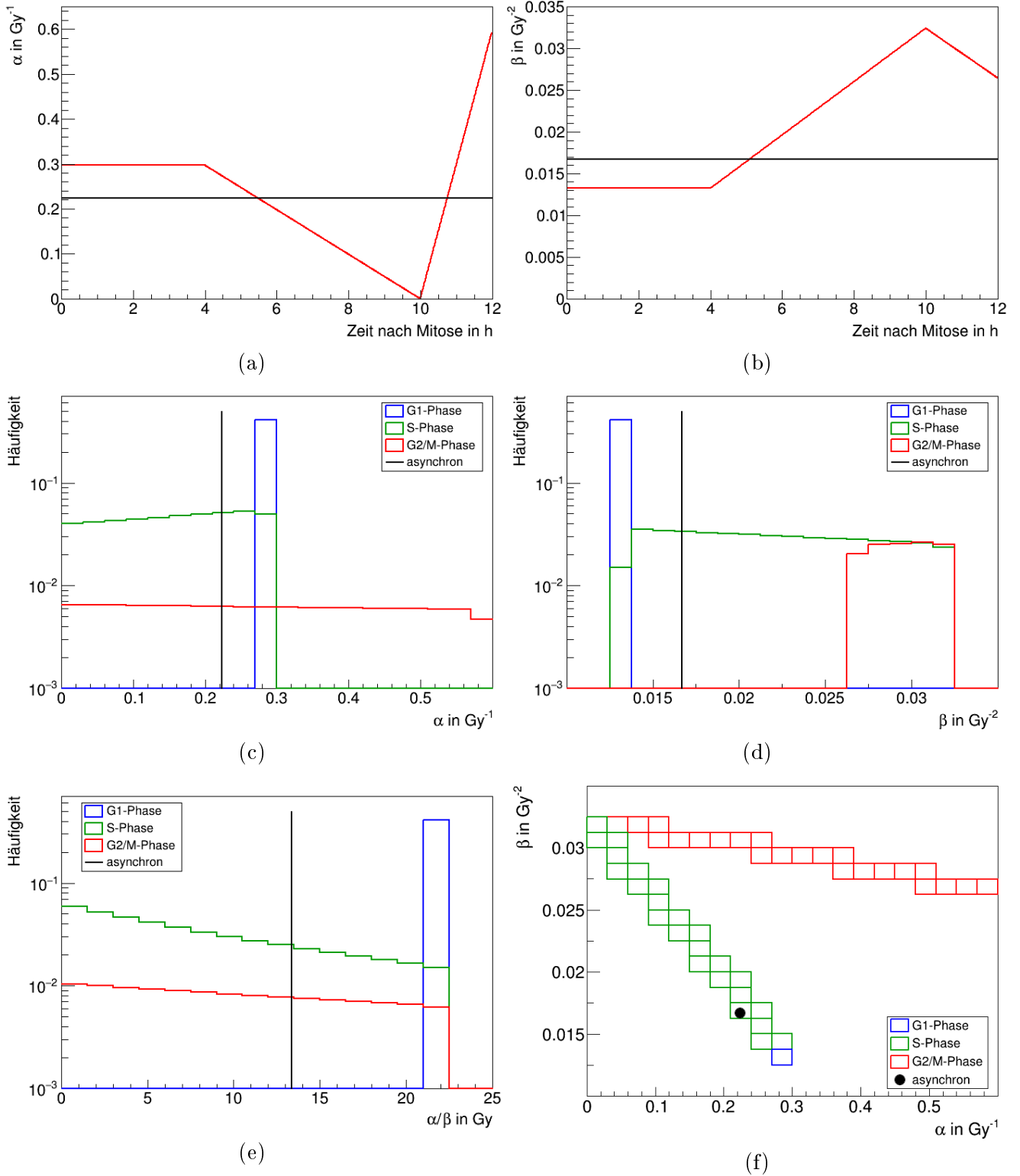
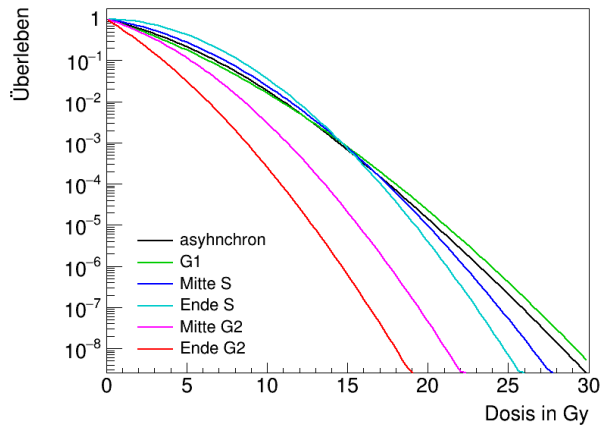
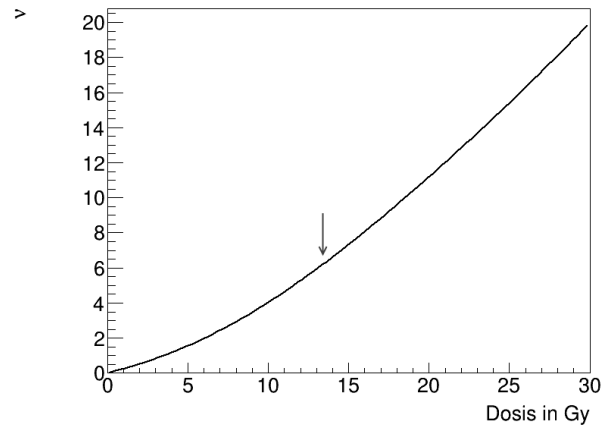


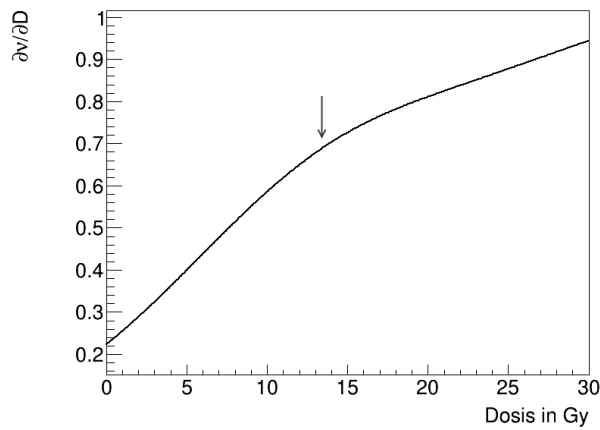
Abbildung 18: Zeitlicher Verlauf und die Häufigkeitsverteilung von α - und β -Parameter der Subpopulationen einer asynchronen Zellpopulation. Die Vorhersage erfolgt mit dem GLOBLE-Modell und den Letalitäten von CHO-Zellen ($\epsilon_{i,1} = 0.0099, \epsilon_{i,2} = 0, \epsilon_c = 0.108$, Kap. 4.1.1). Es werden für jeden Zeitpunkt-nach-Mitose die LQ-Parameter bestimmt und in Abbildung a und b dargestellt. Die α - und β -Parameter der asynchronen Zellpopulation sind durch schwarze Linien gekennzeichnet. Anschließend wird die Häufigkeit der Häufigkeit unter der Annahme einer asynchronen Zellpopulation bestimmt. Die Beiträge werden nach Zellzyklusphase farblich zusammengefasst. Abbildung c zeigt die Verteilung des α -Parameters, d die des β -Parameters, e die des Verhältnis α/β und f alle α, β -Kombinationen in einer zweidimensionalen Darstellung.



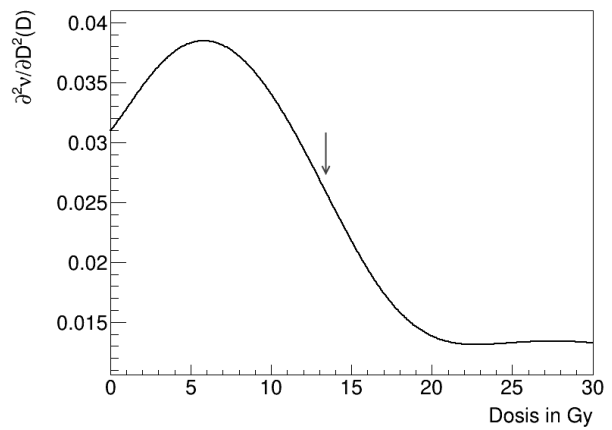
(a) Überleben synchroner Zellen



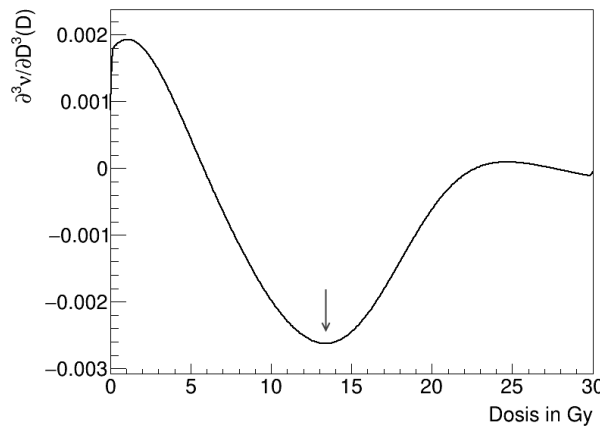
(b) Effekt ν asynchroner Zellen



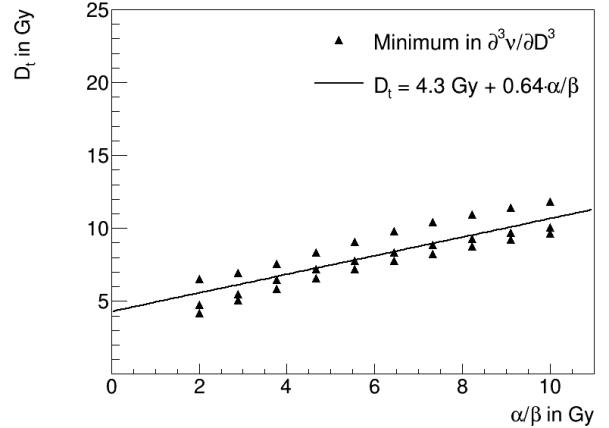
(c) 1. Ableitung: $\partial \nu / \partial D$



(d) 2. Ableitung: $\partial^2 \nu / \partial D^2$



(e) 3. Ableitung: $\partial^3 \nu / \partial D^3$



(f) D_T in Abhängigkeit von α/β

Abbildung 19: Zellzykusspezifisches Überleben und die resultierende Form von Überlebenskurven asynchroner Zellen. Abbildung a zeigt das Überleben synchroner Zellen in den unterschiedlichen Zellzyklusphasen und das einer asynchronen Zellpopulation. Abbildung b zeigt den Effekt ($\nu = -\ln(S)$) einer asynchronen Zellpopulation nach Photonenbestrahlung. Die Abbildungen c bis e zeigen die erste bis dritte Ableitung des Effekts. Der Pfeil markiert in den Abbildungen b-e die Übergangsdosis. Abbildung 19f zeigt den Zusammenhang zwischen dem α/β -Verhältnis der Überlebenskurven und der Übergangsdosis D_T . Für die Abbildungen a-e werden die LQ-Parameter $\alpha = 0.22 \text{ Gy}^{-1}$, $\beta = 0.017 \text{ Gy}^{-2}$ und die damit bestimmten GLOBLE-Parameter $\epsilon_{i,1} = 0.0099$, $\epsilon_{i,2} = 0$, $\epsilon_c = 0.108$ verwendet. Für Abbildung f α/β -Parameter im Wertebereich 2-10 Gy, mit den β -Werten 0.02; 0.045; 0.07 Gy^{-2} .

4.1.4 Zellüberleben asynchroner und synchroner CHO-Zellen nach Hochdosisbestrahlung

In Kapitel 4.1.3 (Abb. 19a) wird gezeigt, dass das GLOBLE-Modell eine höhere Sensitivität der Zellen in der S-Phase, relativ zu denen in der G1-Phase, nach hohen Dosen Photonenstrahlung vorhersagt. Dies widerspricht einerseits den Erwartungen, die aufgrund der bisherigen Datenlage bestehen. Andererseits wurden bisher keine systematischen Untersuchungen dahingehend durchgeführt. Da Zellen der S-Phase sensibler als die der G1-Phase gegenüber hoch-LET-Strahlung sind und hoch-LET-Strahlung mit hohen lokalen Dosen verbunden ist, scheint eine derartige Veränderung der Radiosensitivität plausibel. Mit dem Ziel diese Vorhersage des GLOBLE-Modells zu untersuchen werden Experimente durchgeführt, mit denen das Zellüberleben synchroner Zellen im Dosisbereich von 0 bis ca. 30 Gy gemessen wird. Die hier vorgestellten experimentellen Daten wurden in Zusammenarbeit mit Sylvie Lerchls Masterarbeit [91] gesammelt.

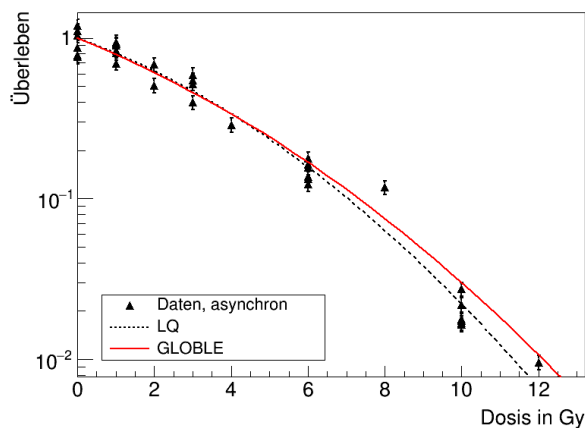
Zellzykluszustand	α in Gy^{-1}	β in Gy^{-2}	α/β in Gy
asynchron	0.198 ± 0.011	0.0183 ± 0.0012	10.9
G1-Phase	0.158 ± 0.009	0.0241 ± 0.0009	6.7
S-Phase	0.059 ± 0.007	0.0231 ± 0.0005	2.5

Tabelle 6: Parameter der Anpassung des LQ-Modells an das Überleben asynchroner und synchroner CHO-Zellen in G1- und S-Phase [91].

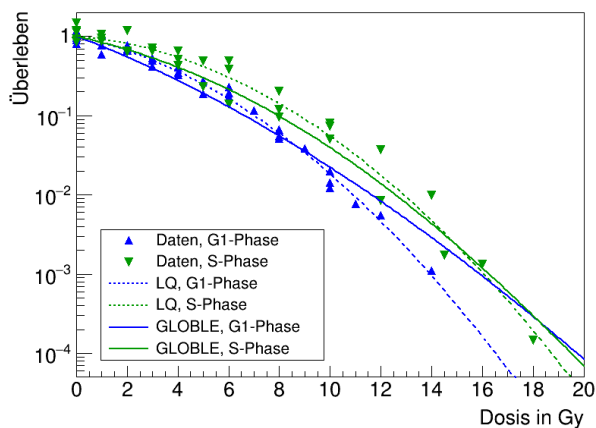
Für die Versuche wurde ein Protokoll zur Synchronisation von CHO-Zellen etabliert (Kap. 3.2.2). Für den Niedrigdosisbereich wird das klonogene Überlebensassay in seiner Standard-Variante verwendet. Für den Hochdosisbereich wird eine Abwandlung davon, das MCP-Assay, etabliert (Kap. 3.2.4). Überlebenskurven asynchroner CHO-Zellen werden in Form des klonogenen Überlebensassay viermal aufgenommen. Die Überlebenskurven synchroner CHO-Zellen in G1- und S-Phase (4 h und 13 h nach Synchronisation) wurden mit dem klonogenen Überlebensassay dreimal aufgenommen. An die asynchronen und synchronen Überlebenskurven wurde jeweils das LQ-Modell angepasst. Die LQ-Parameter sind in Tabelle 6 aufgelistet. Die Versuche zeigen genau die erwarteten Ergebnisse: Zellen in der S-Phase zeigen eine höhere Resistenz gegenüber der Photonenstrahlung, damit ein kleineres α/β -Verhältnis als Zellen in der G1-Phase. Als statistische Unsicherheiten werden 10 % des Überlebens angenommen.

Das GLOBLE-Modell wird zwei mal an die Versuchsdaten angepasst: einmal an die Versuchsdaten mit synchronen Zellen und einmal an die Versuche mit asynchronen Zellen. Für die Versuche mit synchronen Zellen wird das GLOBLE-Modell simultan an die Überlebenskurven der Zellen in G1- und S-Phase angepasst (Populationsparameter s. Kap. 3.1.1). Für die Anpassung an das Überleben asynchroner Zellen wird die asynchrone Population, wie in Kapitel 3.1.2 beschrieben, verwendet. Die erhaltenen GLOBLE-Parameter beider Anpassungen sind in Tabelle 7 aufgelistet. Die $\epsilon_{i,1}$ beider Anpassungen stimmen innerhalb einer Standardabweichung miteinander überein. Die Differenz der ϵ_c beträgt 2.6 Standardintervalle. Für alle grafischen Auftragungen und folgenden Vergleiche werden die Parameter der Anpassung an die synchronen Zellen verwendet. Diese beruhen auf einer größeren statistischen Stichprobe. Außerdem soll überprüft werden, ob Überlebenskurven asynchroner und synchroner Zellen durch die selben Parameter beschrieben werden können.

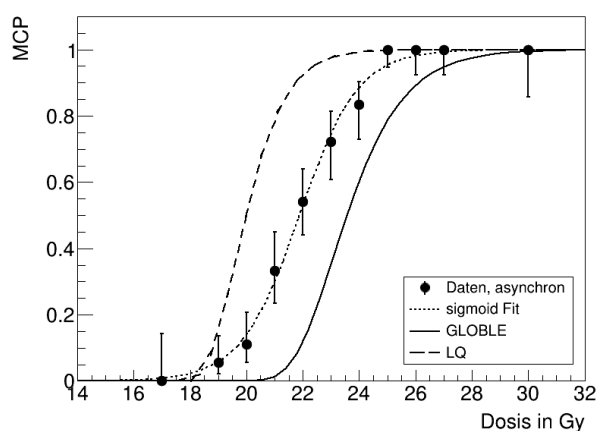
Die oben beschriebenen Daten, sowie LQ- und GLOBLE-Modellanpassungen, sind in Abbildung 20a für asynchrone und Abbildung 20b für synchrone Zellen dargestellt. Die Daten werden durch das LQ-Modell



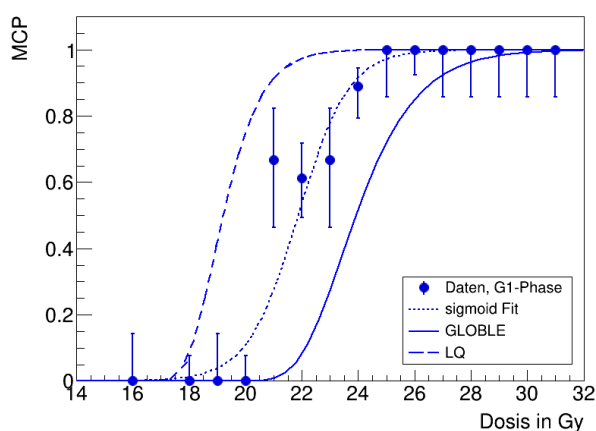
(a) Überleben - asynchrone Zellen



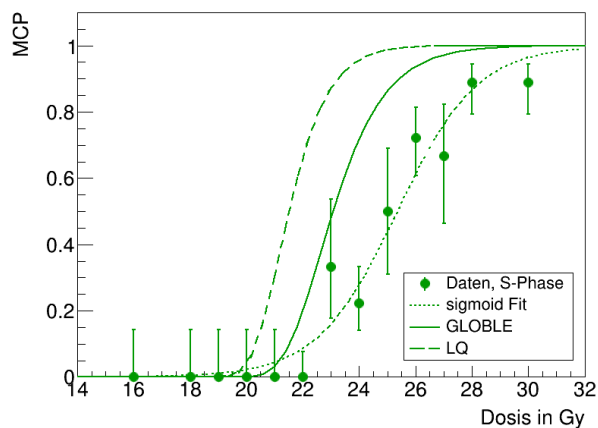
(b) Überleben - synchrone Zellen in G1- und S-Phase



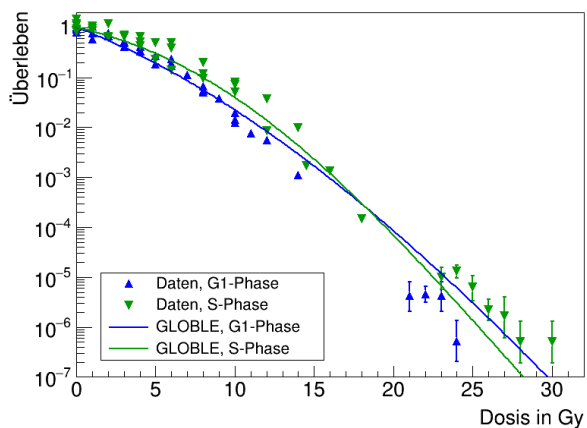
(c) MCP - asynchrone Zellen



(d) MCP - Zellen in G1-Phase



(e) MCP - Zellen in S-Phase



(f) Überleben von Zellen in G1- und S-Phase

Abbildung 20: Ergebnisse der Experimente mit asynchronen und synchronen CHO-Zellen. Abbildung a zeigt das klonogene Überleben der CHO Zellen, mit LQ-Fit und GLOBLE-Vorhersage basierend auf der Anpassung an Überleben synchroner Zellen. Abbildung b zeigt das klonogene Überleben synchroner CHO-Zellen in G1- und S-Phase, die Anpassung des LQ-Modells und simultane Anpassung des GLOBLE-Modells. Abbildungen c,d und e zeigen jeweils die MCP Messungen asynchroner Zellen, Zellen in G1- und Zellen in S-Phase. Abbildung f zeigt eine Zusammenfassung des Überlebens synchroner Zellen in G1- und S-Phase: Messungen des klonogenen Überlebensassay und Daten des MCP-Assay, die zum Zellüberleben umgerechnet werden. Die dazugehörigen GLOBLE-Vorhersagen werden an die Überlebenskurven des klonogenen Überlebensassay angepasst und extrapoliert. Daten aus Ref. [91].

	GLOBLE synchron	GLOBLE asynchron	GLOBLE-MS	GLOBLE-scale
$\epsilon_{i,1}$	0.0094 ± 0.0005	0.0082 ± 0.0011	0.0086 ± 0.0004	0.0057 ± 0.0004
$\epsilon_{i,2}$	0.0000 ± 0.0001	0	0.0000 ± 0.0001	0.0000 ± 0.0002
ϵ_c	0.091 ± 0.004	0.117 ± 0.009	0.114 ± 0.003	0.175 ± 0.005

Tabelle 7: Parameter der angepassten GLOBLE-Modellvarianten.

gut beschrieben, da diese symmetrisch um die angepassten Kurven streuen. Das GLOBLE-Modell unterschätzt das Überleben asynchroner Zellen und Zellen in G1-Phase für Dosen bis ≈ 8 Gy. Für höhere Dosen wird das Überleben überschätzt. Das Überleben der Zellen in S-Phase wird im gesamten Dosisbereich durch das GLOBLE-Modell unterschätzt. Der Einfluss des Zellzyklus auf das Überleben wird in groben Zügen wiedergegeben. Dabei spielt der Dosisbereich der Anpassung eine große Rolle. Wird die Anpassung an den Dosisbereich 0-10 Gy durchgeführt (Abbildung nicht gezeigt), so werden die Daten in diesem Bereich wesentlich besser beschrieben. Eine Extrapolation zu höheren Dosen führt jedoch größeren Abweichungen. Das GLOBLE-Modell sagt eine Kreuzung der Überlebenskurven von Zellen in G1- und S-Phase nach Bestrahlung mit 18 Gy Photonenstrahlung vorher.

Um die durch das GLOBLE-Modell vorhergesagte Kreuzung der Überlebenskurven von Zellen in G1- und S-Phase zu untersuchen, wird die Dosiseffektcurve bei hohen Dosen durch das MCP-Assay vermessen. Diese wird viermal mit 110.000 asynchronen CHO-Zellen im Dosisbereich 17-31 Gy durchgeführt. Die Ergebnisse werden in jeweils 1 Gy Intervalle zusammengefasst. Zusätzlich wird je eine Messung mit 100 und 10.000* Zellen durchgeführt, deren Daten hier nicht einzeln gezeigt werden, aber in die spätere Analyse des gesamten Datensatzes mit einfließen. Anschließend werden drei Messungen mit 110.000 CHO-Zellen in G1- und S-Phase durchgeführt.

Zellzyklus Zustand	b_0	b_1 in Gy^{-1}	D_{50} in Gy
asynchron	-22 ± 4	1.00 ± 0.16	21.7 ± 0.2
G1-Phase	-25 ± 5	1.2 ± 0.2	21.7 ± 0.3
S-Phase	-22 ± 4	0.87 ± 0.15	25 ± 0.3

Tabelle 8: Parameter der angepassten sigmoiden Funktion (Gl. 43) an die MCP-Messungen asynchroner und synchroner CHO-Zellen in G1- und S-Phase.

Eine logistische Funktion zur Verdeutlichung der Dosis-Effekt-Beziehung wird an die MCP-Daten angepasst. Die Parameter sind in Tabelle 8 aufgelistet. Ein Vergleich der D_{50} Werte der logistischen Anpassungen zeigt, dass Zellen der S-Phase deutlich resistenter sind als die der G1-Phase. Demzufolge tritt die durch das GLOBLE-Modell vorhergesagte Kreuzung der Überlebenskurven von Zellen in G1- und S-Phase im untersuchten Dosisbereich nicht ein.

Als Vergleich wird die LQ-Modellanpassung an Daten des klonogenen Überlebens in den Hochdosisbereich extrapoliert und in MCP umgerechnet. Ebenso wird mit den GLOBLE-Modellanpassungen für synchrone und asynchrone Zellen verfahren. Die Daten des MCP-Assay, die Anpassung der sigmoiden Kurve sowie die Extrapolationen des LQ- und GLOBLE-Modells sind für asynchrone Zellen in Abbildung 20c, Zellen in G1-Phase in Abbildung 20d und für Zellen in S-Phase in Abbildung 20e dargestellt. Das

* hier ist die Zellzahl nicht so genau bekannt, da keine Zählung zum Zeitpunkt der Bestrahlung durchgeführt wurde. Diese wird aus der erwarteten PE und Wachstumskurve (Daten nicht gezeigt) der CHO-Zellen bestimmt.

LQ-Modell unterschätzt das Zellüberleben in dem Dosisbereich 17-31 Gy. Die GLOBLE-Vorhersage, basierend auf dem Überleben synchroner Zellen, überschätzt das Überleben asynchroner Zellen. Die D_{50} Dosis ist um etwa 1.8 Gy größer als die der logistischen Anpassung. Die entsprechende Vorhersagen, basierend auf der Anpassung an das Überleben asynchroner Zellen (Daten nicht gezeigt), unterschätzen das Überleben. Die D_{50} Dosis ist um etwa 1.5 Gy kleiner als die der logistischen Anpassung. Dem zufolge liegt die Diskrepanz im Rahmen der experimentellen Unsicherheiten der Extrapolation. Die GLOBLE-Vorhersage überschätzt das Überleben für Zellen in G1-Phase. Für Zellen in S-Phase wird das Überleben durch das GLOBLE-Vorhersage unterschätzt.

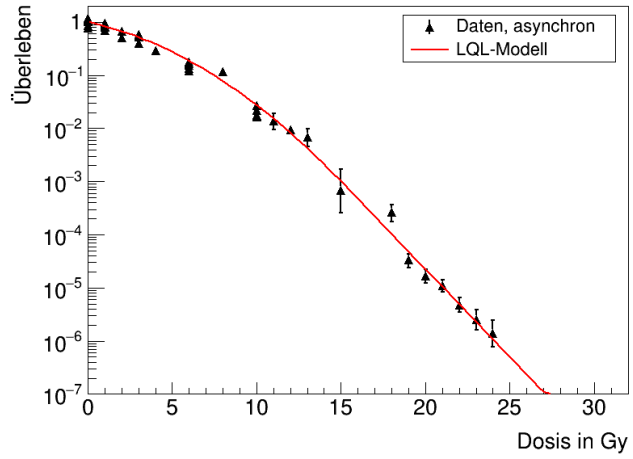
Für eine bessere Übersicht der Daten des Niedrig- und Hochdosisbereichs werden die MCP-Daten in Zellüberleben umgerechnet. Anschließend werden diese zusammen mit den Daten des klonogenen Assays und der GLOBLE-Vorhersagen für Zellen in G1- und S-Phase wird in Abbildung 20f dargestellt. Die Kreuzung der GLOBLE-Vorhersagen für Zellen in G1- und S-Phase bei der Dosis 18 Gy ist deutlich zu sehen. Die Daten zeigen jedoch, dass Zellen der S-Phase über den gesamten Dosisbereich resistenter sind als die der G1-Phase.

Zellzyklus Zustand	α in Gy^{-1}	β in Gy^{-2}	D_T in Gy	α/β in Gy	s_{max} in Gy^{-1}
asynchron	0.197 ± 0.003	0.0184 ± 0.0003	14.6 ± 0.7	10.7	0.74 ± 0.03
G1-Phase	0.135 ± 0.003	0.0272 ± 0.0003	9.9 ± 0.3	5.0	0.676 ± 0.0149
S-Phase	0.066 ± 0.002	0.02261 ± 0.00017	14.3 ± 0.3	2.9	0.712 ± 0.016

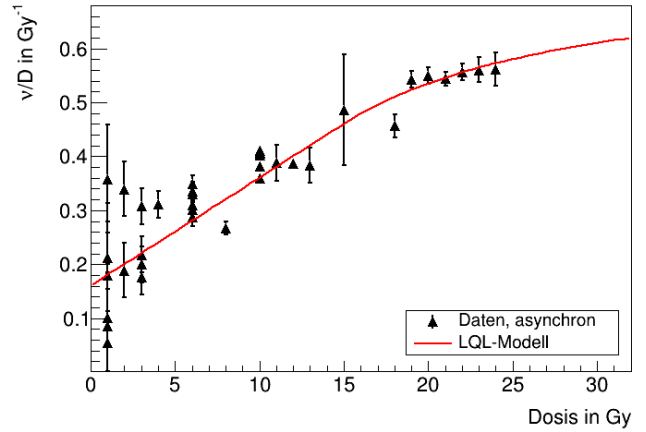
Tabelle 9: Parameter der Anpassung des LQL-Modells an die Überlebens- und MCP-Messungen asynchroner und synchroner CHO-Zellen in G1- und S-Phase.

Da Überlebenskurven nach hohen Dosen Photonenstrahlung häufig durch das LQL-Modell beschrieben werden, wird dies ebenfalls an die Daten des klonogenen Überlebensassay und MCP-Assays angepasst. Die Parameter werden mit einer Maximum-Likelihood-Schätzung (Kap. 3.2.5) bestimmt und in Tabelle 9 angegeben. Die dazugehörigen Überlebenskurven sind in den Abbildungen 21a für asynchrone, 21c für synchrone Zellen in G1- und 21e für synchrone Zellen in S-Phase zusammen mit den Daten dargestellt. Der dosisabhängige Verlauf der Datenpunkte wird gut von der LQL-Kurve wiedergegeben. Um die Abweichung von der LQ-Form zu verdeutlichen, wird der Quotient aus Effekt und Dosis ν/D für asynchrone Zelle, Zellen in G1- und Zellen in S-Phase entsprechend in den Abbildungen 21b, 21d und 21f dargestellt.

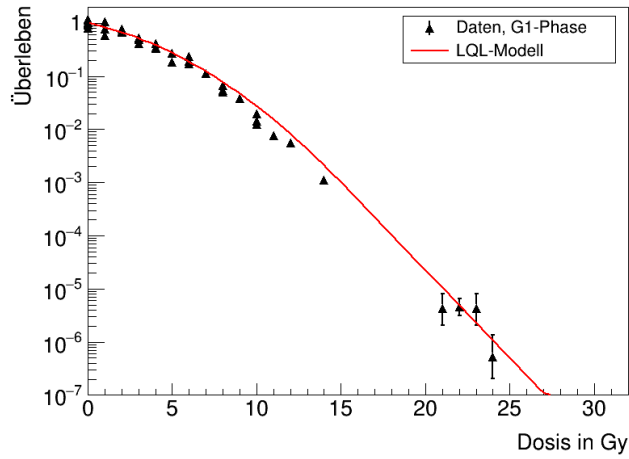
Für asynchrone Zellen und synchrone Zellen in S-Phase ergeben die Anpassungen des LQ- sowie LQL-Modells innerhalb der Fehlerbalken die gleichen α - und β -Parameter (vgl. Tab. 6 für LQ und Tab. 9 für LQL). Für Zellen der G1-Phase zeigt die Anpassung des LQL-Modells ein kleineres α/β -Verhältnis und eine Abweichung der α - und β -Parameter um 2.4 und 3.3 Standardintervalle. Die maximalen Steigungen aller drei Anpassungen sind innerhalb von zwei Standardintervallen miteinander verträglich. Die Daten zeigen, dass die maximale Steigung s_{max} eine Konstante sein könnte, unabhängig von der Zellzyklusverteilung. Das GLOBLE-Modell sagt jedoch unterschiedliche Steigungen vorher (vgl. Abb. 20f). Aus den Darstellungen des ν/D geht hervor, dass synchrone und asynchrone CHO-Zellen für hohe Dosen einen Übergang von kleinen zu großen α/β -Verhältnissen aufweisen.



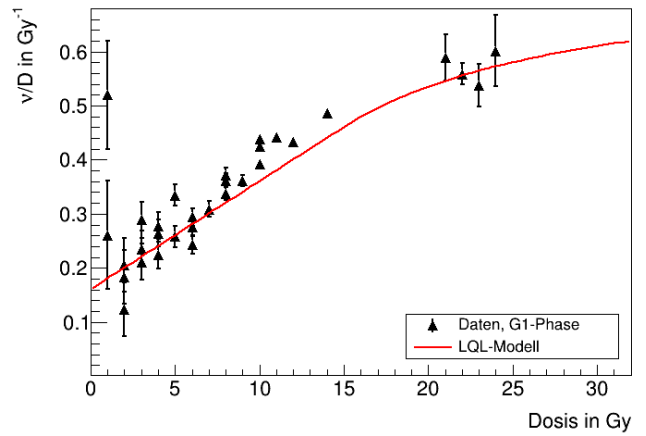
(a) Überleben, asynchrone Zellen



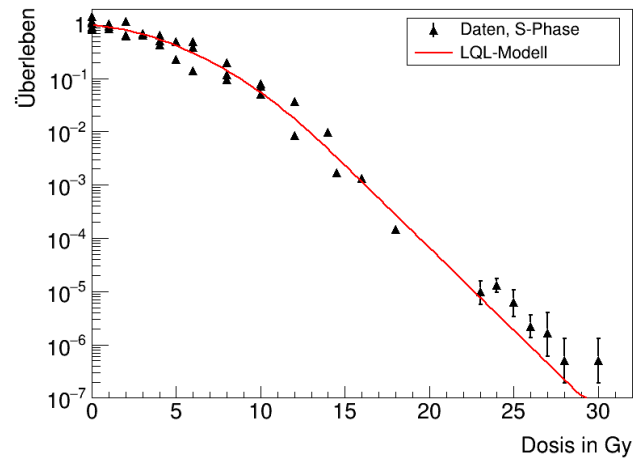
(b) ν/D , asynchrone Zellen



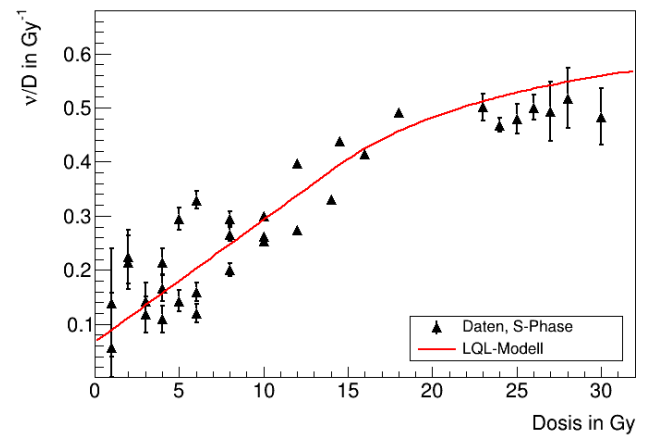
(c) Überleben, Zellen in G1-Phase



(d) ν/D , Zellen in G1-Phase



(e) Überleben, Zellen in S-Phase



(f) ν/D , Zellen in S-Phase

Abbildung 21: Daten des klonogenen Überlebensassay und MCP-Assay wird zum Zellüberleben zusammengefasst und das LQL-Modell wird angepasst. Es sind jeweils die Daten und die LQL-Kurve des Überlebens und dem Quotient aus Effekt und Dosis ν/D für asynchrone Zellen in a und b, synchron Zellen in G1-Phase in c und d, und synchronen Zellen am Ende der S-Phase in e und f gezeigt. Experimentelle Daten aus Ref. [91].

Modellvergleiche

Im Folgenden wird analysiert, wie gut die Modelle LQ, GLOBLE, GLOBLE-MS und GLOBLE-scale die zuvor vorgestellten Überlebenskurven beschreiben. Es wird eine Modellanpassung im Niedrigdosisbereich durchgeführt, anschließend wird analysiert wie gut diese Anpassungen die Daten wiedergeben und wie gut eine Extrapolation in den Hochdosisbereich die Daten beschreibt. Die Daten des klonogenen Überlebensassay stehen stellvertretend für die Daten des Niedrigdosisbereichs und die des MCP-Assay für die Daten des Hochdosisbereichs. Im Folgenden werden alle Daten (klonogenes Überleben und MCP) jeweils nach Status der Synchronisation zusammengefasst und als Überlebenswahrscheinlichkeit in den Abbildungen 22, 23 und 24 dargestellt. Der Vergleich erfolgt unter Zuhilfenahme der Reduzierten χ^2 -Werte der Anpassungen (bzw. Extrapolationen), angegeben in Tabelle 10. Eine Untersuchung (Daten nicht gezeigt) ergab, dass die Daten im Niedrigdosisbereich symmetrisch um die LQ-Kurve streuen. Dadurch wird verdeutlicht, dass sich das LQ-Modell als Referenz eignet. Es ist zu beachten, dass es sich bei der GLOBLE-Vorhersage des Überlebens asynchroner Zellen um keine Anpassung, sondern eine Extrapolation aus der Anpassung an synchrone Zellen handelt.

	LQ		GLOBLE		GLOBLE-MS		GLOBLE-scale	
Bereich	niedrig	gesamt	niedrig	gesamt	niedrig	gesamt	niedrig	gesamt
G1-Phase	3.1	5.6	10.8	10.6	7.4	6.8	3.2	3.7
S-Phase	14.4	21.0	20.1	17.9	14.9	15.7	14.4	16.7
asynchron	4.2	4.5	5.9	7.2	8.1	7.7	10.7	9.6

Tabelle 10: Reduziertes χ^2 der Modellvergleiche zwischen Daten und LQ-, GLOBLE-, GLOBLE-MS-, und GLOBLE-scale-Modell. Die dazugehörigen Grafiken sind in den Abbildungen 22, 23 und 24 dargestellt.

Wie bereits erwähnt, beschreibt Die LQ-Modellanpassungen die Daten im Niedrigdosisbereich sehr gut, da die Datenpunkte aller Versuche symmetrisch um die Fitkurven streuen. Das Überleben im Hochdosisbereich wird hingegen in allen Fällen unterschätzt. Für Überlebenskurve der S-Phase ist dies besonders stark ausgeprägt.

Die GLOBLE-Vorhersage beschreibt das Überleben asynchroner Zellen im Niedrigdosisbereich ähnlich gut wie das LQ-Modell, die Extrapolation zu hohen Dosen überschätzt die Überlebenswahrscheinlichkeit. Insgesamt ist die Abweichung zu den Daten der asynchronen Zellen etwas größer als für das LQ-Modell. Bei der Überlebenskurve der Zellen in G1-Phase fällt auf, dass diese verzerrt durch das GLOBLE-Modell wiedergegeben werden: unterhalb von 10 Gy wird das Überleben etwas unterschätzt, oberhalb davon ist es leicht überschätzt. Über den gesamten Dosisbereich gibt das GLOBLE-Modell das Überleben der Zellen in G1-Phase am schlechtesten wieder. Das Überleben der Zellen in S-Phase wird durch das GLOBLE-Modell bis ca. 10 Gy leicht unterschätzt, wodurch dies die Daten etwas schlechter beschreibt als das LQ Modell. Das Überleben nach hohen Dosen wird leicht unterschätzt. Insgesamt beschreibt die Anpassung des GLOBLE-Modells die Daten besser als die des LQ-Modells.

Das GLOBLE-MS-Modell überschätzt das Überleben der asynchronen Zellen leicht über den gesamten Dosisbereich. Dadurch beschreibt es das Überleben bei niedrigen und hohen Dosen etwas schlechter als das LQ und GLOBLE-Modell. Die Beschreibung des Überlebens der Zellen in G1-Phase unterhalb von 10 Gy ist etwas besser als durch das GLOBLE-Modell, jedoch immer noch leicht verzerrt und schlechter als durch das LQ-Modell. Die hohen Dosen werden jedoch gut beschrieben. Das Überleben der Zellen der

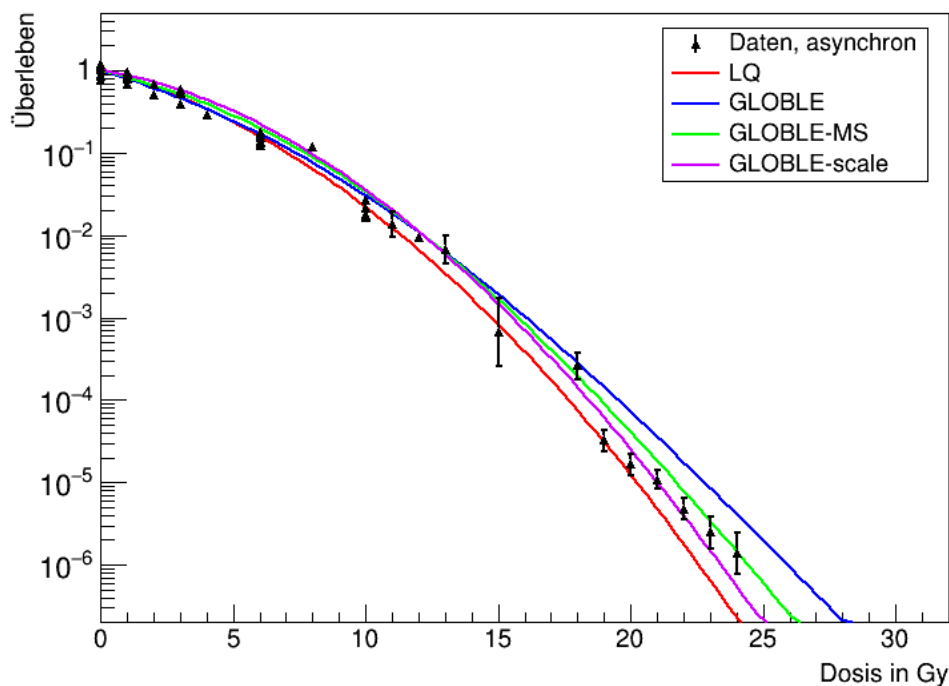


Abbildung 22: Überleben asynchroner CHO-Zellen, zusammengefasst aus dem klonogenen- und MCP Assay, sowie die Anpassung des LQ-Modells (rote Linie), GLOBLE-Modellvorhersage basierend auf Überleben synchroner Zellen (blaue Linie), entsprechend GLOBLE-MS-Modell (grüne Linie) und GLOBLE-scale-Modell (violette Linie). Daten aus Ref. [91]

S-Phase wird im Niedrigdosisbereich ähnlich gut wie durch das LQ-Modell beschrieben. Für hohe Dosen ist die Beschreibung des GLOBLE-MS-Modells besser als die des LQ- und GLOBLE-Modells.

Das GLOBLE-scale-Modell überschätzt das Überleben der asynchronen Zellen im Niedrigdosisbereich. Die Abweichung zu den Daten ist die größte der vorgestellten Modelle. Über den gesamten Dosisbereich gesehen gibt es die Daten am schlechtesten wieder. Das GLOBLE-scale-Modell beschreibt das Überleben von Zellen G1- und S-Phase unterhalb von 18 Gy sehr gut, vergleichbar mit dem LQ-Modell. Die Extrapolation zu hohen Dosen beschreibt das Überleben für Zellen in G1-Phase am besten; für Zellen in S-Phase ist die Extrapolation besser als durch das LQ- und GLOBLE-Modell, jedoch schlechter als durch das GLOBLE-MS-Modell.

Da die reduzierten χ^2 -Werte immer größer als eins sind, ist anzunehmen, dass die angenommene relative statistische Unsicherheit des Überlebens von 10 % die wahre Unsicherheit unterschätzt. Weiterhin fällt auf, dass keines der untersuchten Modelle das Überleben von Zellen in S-Phase nach hohen Dosen gut beschreibt. Diese scheinen aber gleichzeitig mit einer größeren statistischen Unsicherheit verbunden zu sein als die anderen.

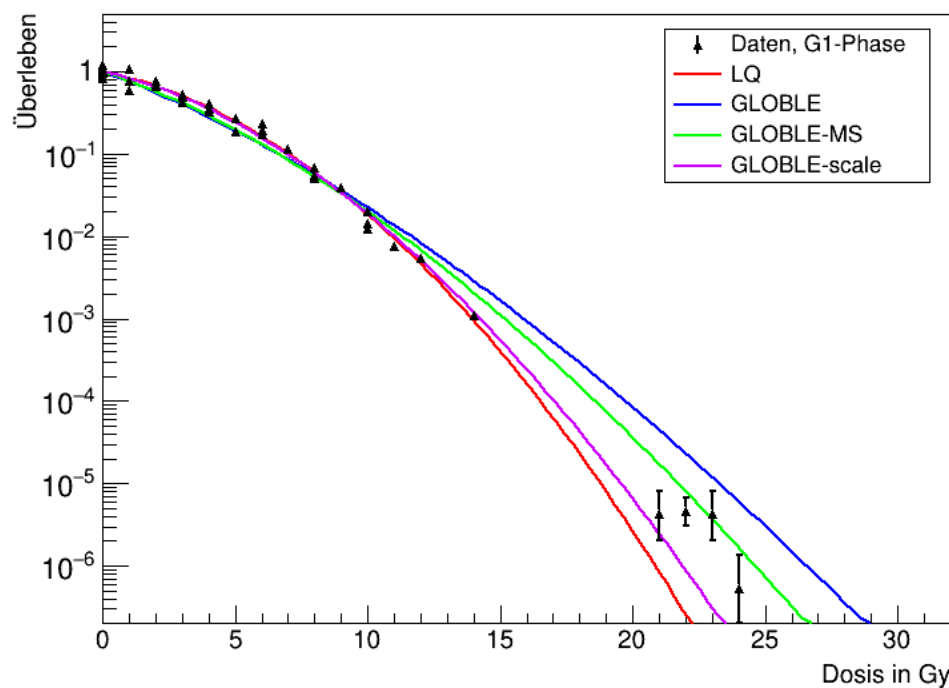


Abbildung 23: Überleben synchroner CHO-Zellen in G1-Phase, zusammengefasst aus dem klonogenen- und MCP Assay, sowie die Anpassung des LQ-Modells (rote Linie), GLOBLE-Modell Anpassung (an G1- und S-Phase Zellen Daten, blaue Linie), entsprechend GLOBLE-MS-Modell (grüne Linie) und GLOBLE-scale-Modell (violette Linie). Daten aus Ref. [91]

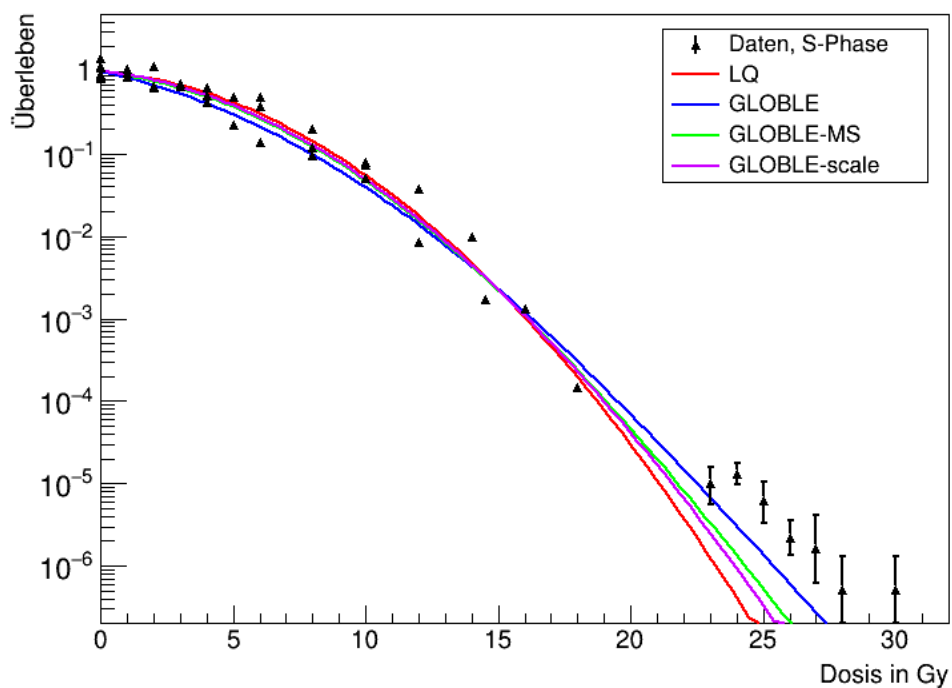


Abbildung 24: Überleben synchroner CHO-Zellen in S-Phase, zusammengefasst aus dem klonogenen- und MCP Assay, sowie die Anpassung des LQ-Modells (rote Linie), GLOBLE-Modell Anpassung (an G1- und S-Phase Zellen Daten, blaue Linie), entsprechend GLOBLE-MS-Modell (grüne Linie) und GLOBLE-scale-Modell (violette Linie). Daten aus Ref. [91]

4.1.5 Modellierung des Überlebens synchroner Zellen nach Ionenbestrahlung

Bisher wurden unterschiedliche Eigenschaften des Zellüberlebens nach Photonenbestrahlung mithilfe des GLOBLE-Modells untersucht. Jetzt soll untersucht werden, ob es möglich ist, diese gewonnenen Erkenntnisse unter Verwendung des LEM zu Ionenstrahlung zu transferieren.

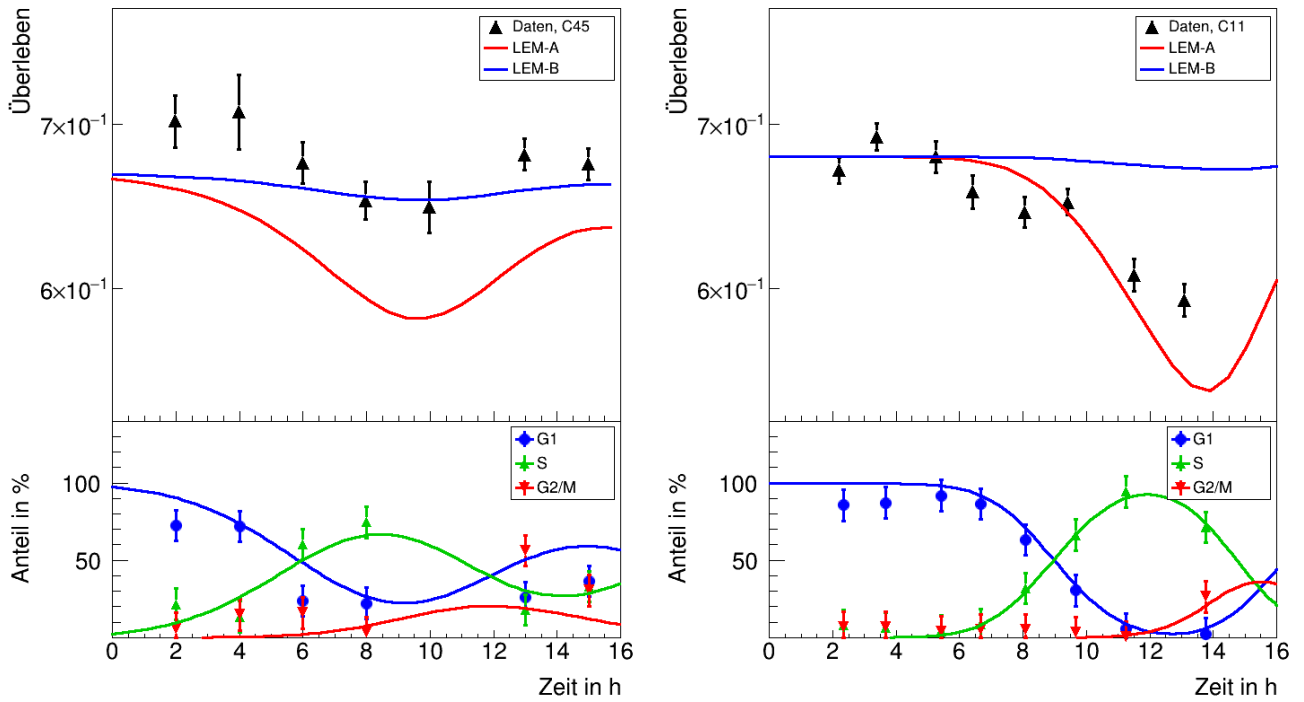
Versuch	Zelllinie	T_0 in h	σ in h	Ionensorte	Energie in MeV/u	LET in keV/ μm
C045	V79	-1.3 ± 0.4	2.9 ± 0.3	^{12}C	4.5	315
C110	V79	-4.76 ± 0.19	1.7 ± 0.2	^{12}C	11	151
Ni089	CHO	-1.58 ± 0.17	1.9 ± 0.2	^{58}Ni	8.9	2932
U130	CHO	-1.8 ± 0.2	2.3 ± 0.2	^{238}U	13.4	13660

Tabelle 11: Messungen des Überlebens synchroner Zellen nach Ionenbestrahlung.

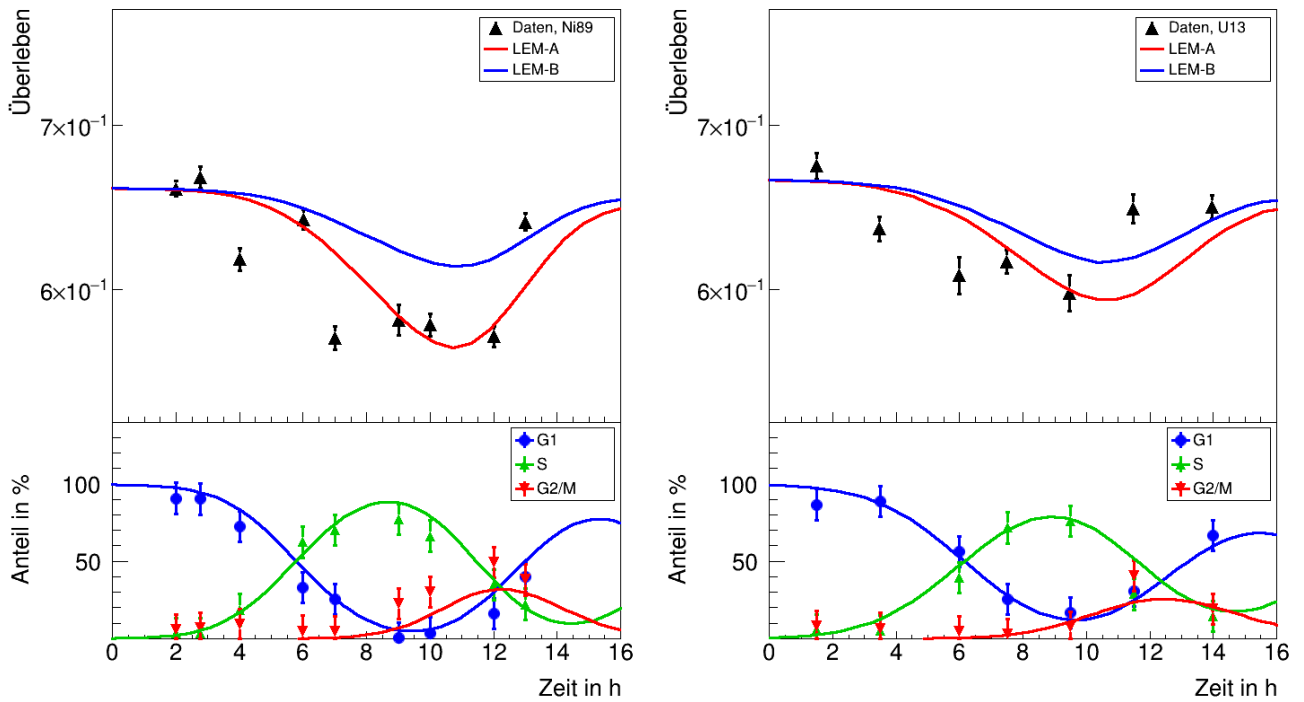
CHO-Ni089		CHO-U130	
t in h	α in Gy^{-1}	t in h	α in Gy^{-1}
2.00	0.208 ± 0.004	1.50	0.0493 ± 0.0015
2.75	0.203 ± 0.005	3.50	0.0567 ± 0.0014
4.00	0.241 ± 0.005	6.00	0.062 ± 0.002
6.00	0.223 ± 0.005	7.50	0.0606 ± 0.0013
7.00	0.278 ± 0.005	9.50	0.064 ± 0.002
9.00	0.270 ± 0.007	11.50	0.0543 ± 0.0017
10.00	0.272 ± 0.005	14.00	0.0541 ± 0.0013
12.00	0.277 ± 0.005	—	—
13.00	0.224 ± 0.004	—	—
V79-C045		V79-C110	
t in h	α in Gy^{-1}	t in h	α in Gy^{-1}
2.00	0.71 ± 0.05	2.20	0.80 ± 0.02
4.00	0.69 ± 0.07	3.40	0.74 ± 0.02
6.00	0.79 ± 0.04	5.25	0.78 ± 0.03
8.00	0.86 ± 0.04	6.40	0.84 ± 0.03
10.00	0.87 ± 0.05	8.05	0.88 ± 0.03
13.00	0.77 ± 0.03	9.40	0.86 ± 0.02
15.00	0.79 ± 0.03	11.50	1.00 ± 0.03
—	—	13.10	1.04 ± 0.03

Tabelle 12: LQ-Parameter der Überlebenskurven, zu den Versuchen in Tab. 11.

Die untersuchten Datensätze wurden von Wilma Kraft-Weyrather [64], ähnlich zu den in Kapitel 4.1.1, erhoben. Entsprechend ist die folgende Auswertung ähnlich zu der vorhergehenden. Die Populationsparameter der Versuche sind mit der verwendeten Zelllinie, Ionensorte, Energie, sowie LET in Tabelle 11 aufgelistet. An die Überlebenskurven wird das LQ-Modell angepasst, die α -Parameter der Anpassung sind in Tabelle 12 dargestellt, die β -Parameter werden weggelassen da diese mit Null verträglich sind. Für die LEM-Überlebensvorhersage synchroner Zellen nach Ionenbestrahlung wird die GLOBLE-Modellvorhersage synchroner Zellen nach Photonenbestrahlung (Kap. Kapitel 4.1.1) ausgewertet. Dabei wird die GLOBLE-Vorhersage als Zwischenschritt in eine LQL-Modellvorhersage transformiert. Zur



(a) V79, Kohlenstoff $E = 4,5$ MeV/u (C045) $D = 0.5$ Gy (b) V79, Kohlenstoff $E = 11$ MeV/u (C110) $D = 0.5$ Gy



(c) CHO, Nickel $E = 8.9$ MeV/u (Ni089) $D = 2$ Gy (d) CHO, Uran $E = 13.4$ MeV/u (U130) $D = 8$ Gy

Abbildung 25: a-d: Daten und LEM-Vorhersage des Überlebens synchroner Zellen nach Ionenbestrahlung als Funktion der Zeit nach Synchronisation (obere Graphen) und die Zellzykluslinetiken (untere Graphen). Die LEM-Vorhersage mithilfe der Extrapolation-A (LEM-A) und mit Extrapolation-B (LEM-B). Daten aus Ref. [64].

Bestimmung der Übergangsdosis D_t werden die zwei vorgestellten Extrapolationen der Dosiseffektkurve nach Photonenbestrahlung zu hohen Dosen, Extrapolation-A und -B (Kap. 3.1.9), verwendet. Das Zellüberleben wird anschließend mit LEM vorhergesagt. Im Folgenden werden Überlebenskurven synchroner Zellen nach Ionenbestrahlung, als Funktion der Zeit nach Synchronisation bei einer konstanten Dosis betrachtet. Die LEM-Vorhersage mit Extrapolation-A und -B ist für V79-Zellen, nach Bestrahlung mit 0.5 Gy Kohlenstoff der Energie 4.5 MeV/u (C045) und 11 MeV/u (C110), in den Abbildungen 25a und 25a dargestellt. Die LEM-Vorhersage des Versuchs C045 mit der Extrapolation-A unterschätzt die Daten systematisch, gibt aber deren Variation der Überlebenswahrscheinlichkeit während des Zellzyklus richtig wieder. Die relative Änderung des Überlebens während des Zellzyklus ist in der LEM-Vorhersage etwas stärker ausgeprägt als in den Daten. Der zeitliche Verlauf der LEM-Vorhersage im Versuch C110 ist ähnlich dem Verlauf des Versuchs C045. Die Daten des Versuchs C110 werden durch die LEM-Vorhersage, mit Extrapolation-A während der G1- und frühen/mittleren S-Phase, gut beschrieben. Die Sensitivierung der Zellen zum Ende der S-Phase ist jedoch stärker ausgeprägt als in den Daten und der LEM-Vorhersage für C045. Die LEM-Vorhersagen mit Extrapolation-B sagen ein nahezu konstantes Zellüberleben während der S-Phase voraus, was nicht zu den Daten der beiden Versuche passt. Das mittlere Überleben wird durch die LEM-Vorhersage mit Extrapolation-B für den Versuch C045 richtig wiedergegeben, während dies für C110 überschätzt wird.

Die LEM-Vorhersagen, mit Extrapolation-A, zeigen für eine Bestrahlung Nickel- (Abb. 25c) und Uranionen (Abb. 25d) für CHO-Zellen qualitativ die gleiche Erhöhung der Sensitivität während der S-Phase wie die Daten. Die Daten werden in der G1-Phase gut durch die Vorhersage beschrieben und die Stärke der Variation während der S-Phase wird korrekt durch das Modell vorhergesagt. Der Zeitpunkt der maximalen Radiosensitivität ist jedoch zwischen den Daten und der LEM-Vorhersagen systematisch verschoben; die Daten erreichen die maximale Sensitivität früher (Mitte S-Phase) als die LEM-Vorhersagen (Ende S-Phase). Die Berechnungen mit Extrapolation-B zeigen während des Zellzyklus den gleichen qualitativen Verlauf wie die mit Extrapolation-A. Jedoch zeigt die Vorhersage eine schwächere Sensitivierung für Zellen in der S-Phase als die Daten.

In allen Rechnungen sagen die LEM-Vorhersagen beider Extrapolationsmethoden zu Beginn des Zellzyklus das gleiche Überleben voraus. Die Variation während des Zyklus ist für Extrapolation-A wesentlich stärker ausgeprägt und entspricht damit mehr dem Verlauf der Daten, überschätzt diesen jedoch teilweise.

Die Unsicherheiten der LEM-Vorhersagen werden untersucht, indem die zugrundeliegenden GLOBLE- und Populationsparameter um jeweils eine Standardabweichung variiert werden. Bei den GLOBLE-Parametern handelt es sich um die Parametern, die benutzt werden um die Dosiseffektkurve nach Photonenbestrahlung vorherzusagen (vgl. Abb. 14). Die Populationsparameter beschreiben die Synchronisationsqualität (Tab. 11). Auf diese Weise wird die LEM-Vorhersage und die Daten des Zellüberlebens als Funktion der Zeit nach Synchronisation, nach Bestrahlung mit 0.5 Gy Kohlenstoffionen (Versuch C045), in Abbildung 26 dargestellt. Die Unsicherheiten der GLOBLE-Parameter haben einen marginalen Einfluss auf das Zellüberleben. Die Unsicherheiten der Populationsparameter führen zu Unsicherheiten des Zellüberlebens, welche in etwa der statistischen Unsicherheit der Daten entsprechen.

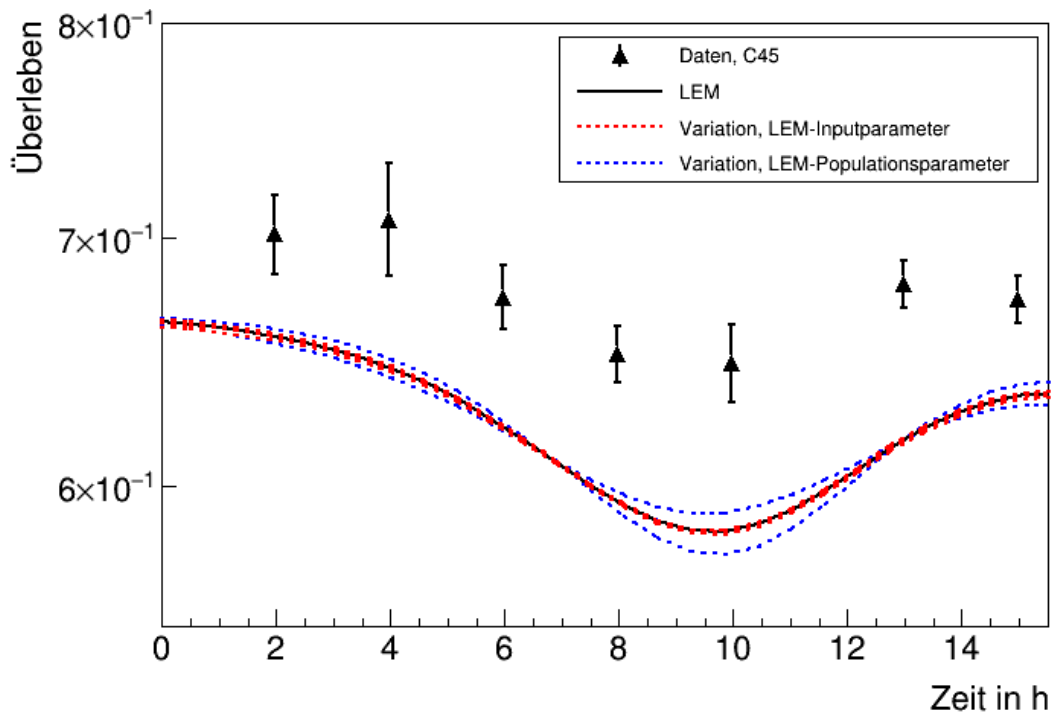
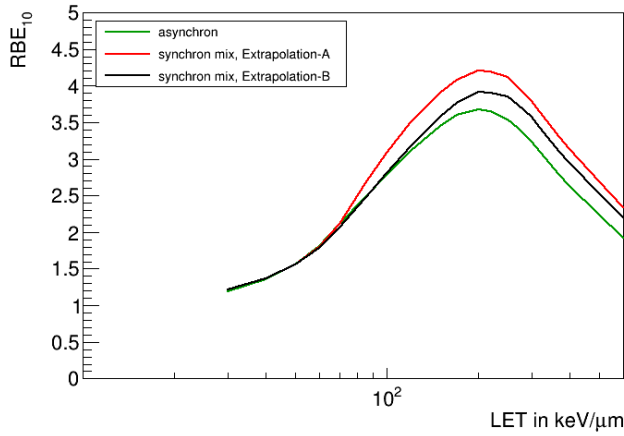
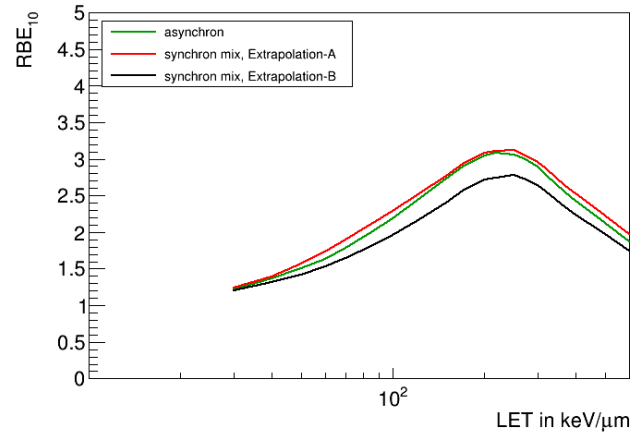


Abbildung 26: Daten, LEM-Vorhersage und Unsicherheit der LEM-Vorhersage für das Überlebens synchroner Zellen nach Bestrahlung mit Kohlenstoffionen der Energie 4.5 MeV/u (Versuch C045), als Funktion der Zeit nach Synchronisation (Analog zu Abb. 25). Die LEM-Vorhersage wurde mit Extrapolation-A durchgeführt. Die Unsicherheiten der LEM-Vorhersage werden bestimmt in dem die Inputparameter und Populationsparameter, um eine Standardabweichung variiert werden.

Bisher nutzt das LEM Überlebenskurven asynchroner Zellen nach Photonenbestrahlung um die RBE vorherzusagen. Jetzt soll überprüft werden, ob die Summe der Überlebenskurven zellzyklusspezifischen Subpopulationen, aus den eine asynchrone Zellpopulation besteht, zu dem gleichen Ergebnis führt. Dafür wird aus den Überlebenskurven synchroner Zellen nach Photonenbestrahlung die Überlebenskurven nach Ionenbestrahlung vorhergesagt. Dies geschieht auf die gleiche Weise wie oben in diesem Kapitel beschrieben. Anschließend wird daraus die Überlebenskurve der asynchronen Population berechnet (Gl. 32). Abschließend wird die Dosis für 10 % Überleben entnommen und die RBE_{10} berechnet. Die so und mit der konventionellen Methode vorhergesagten RBE_{10} -Werte sind als Funktion des LET in Abbildung 27a für CHO- und Abbildung 27b für V79-Zellen dargestellt. Die konventionellen LEM-Vorhersagen werden mit den α, β -Parametern asynchroner CHO- und V79-Zellen aus Tabelle 4 durchgeführt. Die Übergangsdosis D_t wird nach Gleichung 8 bestimmt. Für die Überlebensvorhersage synchroner Zellen werden die gleichen GLOBLE-Parameter wie oben in diesem Kapitel beschrieben verwendet (Tab. 3). Für CHO-Zellen ergeben die Vorhersagen, die den Zellzyklus berücksichtigen, ab einem LET von ca. 60 keV/ μ m mit beiden Extrapolationen höhere RBE-Werte als die konventionelle Methode. Die Vorhersage mit Extrapolation-A führt zu höheren RBE-Werten als mit Extrapolation-B. Für V79-Zellen sagt die Methode mit synchronen Zellen mit Extrapolation-A in etwa die gleichen RBE_{10} -Werte vorher wie die konventionelle Rechnung. Die Vorhersage mit Extrapolation-B unterschätzt die RBE der konventionellen Rechnung. Die Vorhersagen mit Extrapolation-A führt bei beiden Zelllinien zu höheren RBE_{10} -Werten im Maximum als die mit Extrapolation-B. Abgesehen von den Unterschieden in der Höhe der RBE_{10} -Kurven sind keine offensichtlichen Unterschiede der Form von RBE-Kurven sichtbar.



(a) CHO



(b) V79

Abbildung 27: LEM-Vorhersage der RBE_{10} für Kohlenstoffionen bestrahlte CHO-Zellen in a und V79-Zellen in b. Die Vorhersage wird auf drei Arten durchgeführt: 1. mit dem LEM für asynchrone Zellen [15], mit LEM für synchrone Zellen mit Extrapolation-A und mit LEM für synchrone Zellen mit Extrapolation-B.

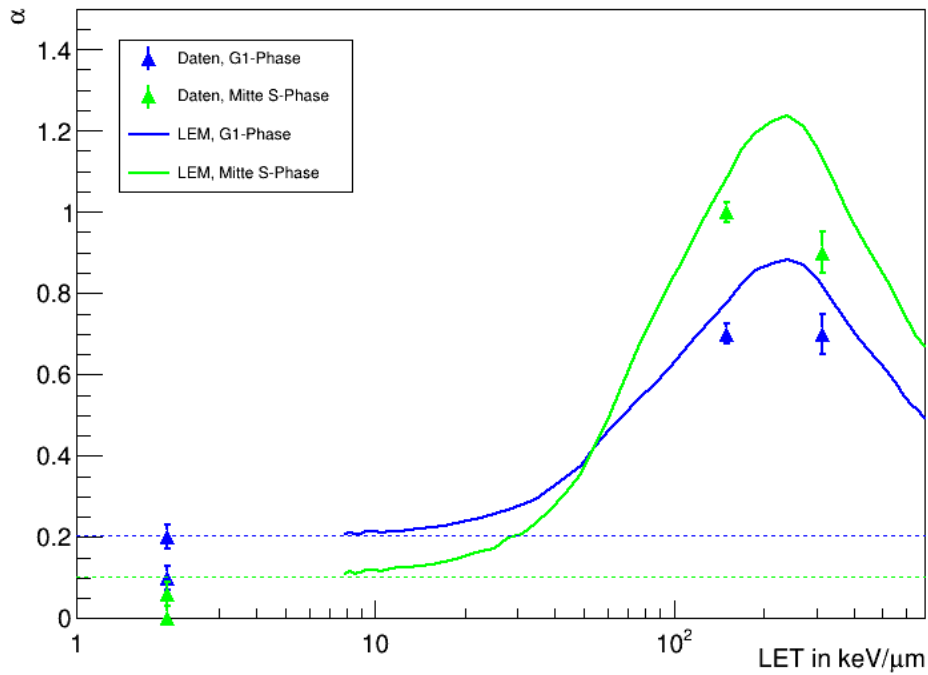


Abbildung 28: LET-abhängige Vorhersage des linearen Parameters des LQ-Modells (α) durch das LEM und gemessenes α von Zellen in G1- und S-Phase. Daten aus Ref. [64].

Nun soll untersucht werden, bei welchem LET die Zellen in S-Phase sensibler werden als in G1-Phase. Dafür werden LEM-Überlebensvorhersagen von V79-Zellen in G1- und S-Phase, nach Kohlenstoffstrahlung mit unterschiedlichem LET, angefertigt. Das LQ-Modell wird an die vorhergesagten Überlebenskurven angepasst. Deren α -Parameter werden als Funktion des LET in Abbildung 28 dargestellt. Die α -Parameter werden betrachtet, da diese den führenden Beitrag zum Effekt, bei typischen therapeutischen Dosen, liefern. Die Datenpunkte werden aus den Überlebenskurven in G1- und S-Phase der

Versuche C045 und C110, sowie Überlebenskurven nach Photonenbestrahlung (Kap. 4.1.1), entnommen. Der Photonenstrahlung wird ein LET von $2 \text{ keV}/\mu\text{m}$; zugewiesen. Bei der LEM-Vorhersage wird angenommen, dass die Zellen ideal in G1- oder Mitte der S-Phase synchronisiert sind, während das für die Daten nicht der Fall ist. Dies führt dazu, dass die Variation der LEM-Vorhersage zwischen G1- und S-Phase stärker als in den Daten ausgeprägt ist. Deshalb stellt dieser Vergleich nur eine Näherung dar. Das LEM sagt die Tendenz der relativen Radiosensitivitäten zwischen G1- und S-Phase im Übergang von niedrig- zu hoch-LET-Strahlung richtig vorher. Die α -Parameter der Zellen in G1- und S-Phase schneiden sich bei einem LET von ca. $60 \text{ keV}/\mu\text{m}$; für niedrigere LET-Werte ist die S-Phase resistenter als die G1-Phase, für höhere sensitiver.

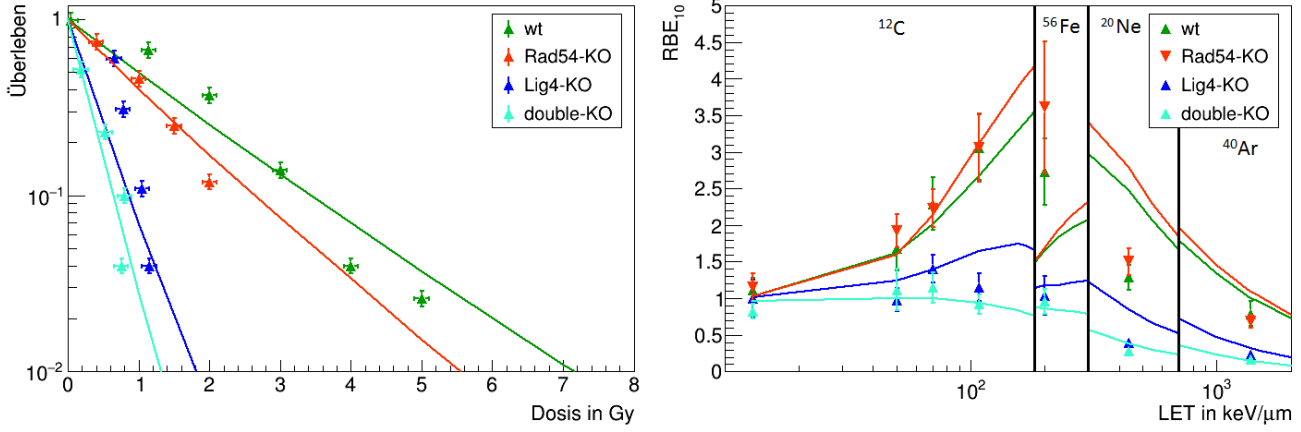
4.1.6 Modellierung der RBE reparaturdefizienter Zellen nach Ionenbestrahlung

Nun wird untersucht, ob die GLOBLE-Vorhersage des Überlebens asynchroner reparaturdefizienter Zellen mittels LEM auf hoch-LET-Strahlung übertragen werden kann. Für diese Analyse werden Daten von Takahashi et al. [99] untersucht. Die Überlebenskurven nach Photonenbestrahlung dieses Datensatzes werden in Kapitel 4.1.2 untersucht. Hier werden die Überlebenskurven nach Ionenbestrahlung betrachtet. Insgesamt handelt es sich um vier Zelllinien (ein Wildtyp und drei reparaturdefiziente Mutanten). Es ist zu beachten, dass verschiedene Ionensorten für die Bestrahlung verwendet wurden. Die im Folgenden untersuchten Einflüsse auf die RBE hängen von der Ionensorte und dem LET ab. Die verwendeten Energie, LET und Ionen sind in Tabelle 13 angegeben.

Ionensorte	Energie in MeV/u	LET in $\text{keV}/\mu\text{m}$
Kohlenstoff	284	13
Kohlenstoff	43	50
Kohlenstoff	29	70
Kohlenstoff	17	108
Eisen	396	200
Neon	10	437
Argon	9	1370

Tabelle 13: In den Versuchen von Takahashi et al. [99] verwendeten Ionensorten mit zugehörigem LET zur Messung von Zellüberlebenskurven. Die Energien für Eisen wird mit SRIM [102], die Anderen nach Ref. [103] berechnet.

Die LEM-Vorhersagen werden mit den in Kapitel 4.1.2 ermittelten Letalitäten sowie der in Kapitel 3.1.8 beschriebenen Methode berechnet. Es wird zuerst das Überleben synchroner Zellen vorhergesagt. Im darauf folgenden Schritt wird dies zum Überleben einer asynchronen Population umgerechnet. Zur Bestimmung der Übergangsdosis D_t wird Extrapolation-A verwendet. Abbildung 29a zeigt die Überlebenskurven nach Kohlenstoffbestrahlung mit einem LET von $108 \text{ keV}/\mu\text{m}$. Zur Bestimmung der RBE_{10} wird das Überleben nach Photonenbestrahlung (Kap. 4.1.2) und die LEM-Vorhersage ausgewertet. Die RBE_{10} -Kurven von Takahashi et al. [99] und die LEM-Vorhersage sind in Abbildung 29b dargestellt. Die LEM-Vorhersage der RBE_{10} für kohlenstoffbestrahlte Zellen ($\text{LET} = 13 - 108 \text{ keV}/\mu\text{m}$) beschreibt den Verlauf der Daten innerhalb der Fehlerbalken. Die Vorhersage der mit Eisen bestrahlten ($\text{LET} = 200 \text{ keV}/\mu\text{m}$) wt- und rad54-KO-Zellen liefert eine RBE_{10} von 1.7, während sich aus den Daten ein RBE_{10} von



(a) ^{12}C , $\text{LET} = 108 \text{ keV}/\mu\text{m}$

(b) RBE_{10}

Abbildung 29: Überleben und RBE reparaturkompetenter und -defizienter Zellen nach Ionenbestrahlung. Abbildung a zeigt Überlebenskurven der vier Zelllinien aus Ref. [99] nach Bestrahlung mit Kohlenstoff Ionen mit einem LET von $108 \text{ keV}/\mu\text{m}$, so wie die entsprechenden Vorhersagen des LEM. Abbildung b zeigt die RBE_{10} Reparatur effizienter und defizienter MEF-Zellen, nach Bestrahlung mit Kohlenstoff-Eisen-, Neon- und Argon Ionen aus Ref. [99] (Datenpunkte) und die dazugehörigen Vorhersagen durch das LEM (Linien). Um die Datenpunkte herum sind Kurvensegmente der LEM-Vorhersage für die gleichen Ionensorten, zur Darstellung des LET-abhängigen RBE_{10} -Verlaufs dargestellt. Die schwarzen vertikalen Linien unterteilen die LET-Skala in Bereiche in denen unterschiedliche Ionensorten verwendet werden.

2.7 ± 0.5 bzw. 3.6 ± 0.9 ergibt. Die RBE Vorhersage für Lig4-KO- und double-KO-Zellen entspricht für die Eisenbestrahlung den Daten. Die Vorhersage für die mit Neon bestrahlten ($\text{LET} = 437 \text{ keV}/\mu\text{m}$) wt-, rad54-KO-, Lig4-KO-Zellen überschätzt die RBE, während die Vorhersage der double-KO-Zellen den Daten entspricht. Die Vorhersage für die mit Argon bestrahlten Zellen ($\text{LET} = 1370 \text{ keV}/\mu\text{m}$) beschreibt die Daten gut, außer dass die RBE_{10} der wt- und Rad54-KO Zellen leicht die Daten überschätzt.

4.2 Diskussion

In diesem Kapitel werden die GLOBLE-Modell- und LEM-Vorhersagen des Zellüberlebens nach Photonen- und Ionenbestrahlung diskutiert. Hierbei werden zuerst die Daten-Modell-Vergleiche des zellzyklusspezifischen Überlebens nach Photonen- und Ionenbestrahlung erörtert. Anschließend werden die Daten-Modell-Vergleiche reparaturdefizienter Zellen verschiedener Strahlenqualitäten behandelt.

4.2.1 Zellzyklusspezifisches Überleben nach Photonen- und Ionenbestrahlung

Zur Vorhersage von Dosiseffektkurven nach Ionenbestrahlung bekommt das LEM zu hohen Dosen hin extrapolierte Dosiseffektkurven nach Photonenbestrahlung als Input und wertet diese mit der lokalen Dosis der Ionenspurs aus [11]–[15]. Entsprechend wird zuerst die GLOBLE-Vorhersage von Dosiseffektkurven nach Photonenbestrahlung diskutiert, danach die Extrapolation zu hohen Dosen und zuletzt die LEM-Vorhersage von Dosiseffektkurven nach Ionenbestrahlung. Das Neue in dieser Arbeit ist, dass dieses Verfahren für synchrone Zellen angewandt wird, während sich vorhergehende Arbeiten mit asynchronen Zellen befassten.

Beschreibung des Zellzyklusspezifischen Überlebens nach Photonenbestrahlung

In der Arbeit von Hufnagl et al. [4] wird bereits die Fähigkeit des GLOBLE-Modells zur Beschreibung des Überlebens synchroner Zellen gezeigt. In dieser Arbeit wird die GLOBLE-Modellvorhersage synchroner CHO- und V79-Zellen anhand von weiteren Datensätzen (Kap. 4.1.1) überprüft. Für CHO-Zellen werden die Daten sehr gut reproduziert. Für V79-Zellen ist die Variation des Überlebens während des Zellzyklus unterschätzt. Weiterhin zeigen die Daten, dass die mittlere S-Phase die resistanteste ist, während das Modell dies für die späte S-Phase vorhersagt. Hinter der GLOBLE-Modellvorhersage steckt die Annahme, dass alle DNA-Regionen gleich wichtig für das Zellüberleben sind. In der Arbeit von Scholz [30] wurde bereits angesprochen, dass dies vermutlich eine zu starke Vereinfachung ist. Es wird eine Modifikation des GLOBLE-Modells vorgestellt, welche annimmt, dass bestimmte Regionen der DNA wichtiger für das Zellüberleben sind als andere. Das GLOBLE-MS-Modell (Kap 3.1.7) nimmt an, dass frühreplizierte DNA wichtiger für das Zellüberleben ist als spätreplizierte. Diese Annahme stützt sich darauf, dass während der S-Phase die euchromatischen, kodierenden sowie die stark transkribierten Bereiche der DNA zuerst repliziert werden [48], [50]–[53] und wichtiger für das Zellüberleben sind als die spätreplizierte DNA. Dadurch wird eine höhere Fehlertoleranz der mit NHEJ reparierten iDSB der spätreplizierten DNA erwartet. Das GLOBLE-MS-Modell kann damit die Überlebenskurven der V79-Zellen besser beschreiben. Es zeigt die höchste Resistenz in der mittleren S-Phase. Ebenfalls ist das Maximum der Resistenz stärker ausgeprägt im Vergleich zum dem GLOBLE-Modell. Die untersuchten Daten der CHO-Zellen werden vom GLOBLE- und GLOBLE-MS-Modell in etwa gleich gut beschrieben. Die Beschreibung des Überlebens reparaturdefizienter Zellen in Kapitel 4.1.2 zeigt für das GLOBLE- und GLOBLE-MS-Modell ähnlich gute Resultate. Die Daten in Kapitel 4.1.4 werden durch GLOBLE-MS etwas besser als durch das GLOBLE-Modell wiedergegeben. Aus der aktuellen Datenlage lässt sich schließen, dass das GLOBLE-MS-Modell eine gute Möglichkeit bietet, frühreplizierte DNA bzw. Euchromatin stärker als das Heterochromatin für das Zellüberleben zu gewichten. Bei den drei untersuchten Zelllinien (CHO, V79, MEF) scheint dies jedoch nur für die V79-Zelllinie erforderlich. Demzufolge scheinen zelllinienspezifische Unterschiede eine

Rolle zu spielen. Eine Möglichkeit dies zu berücksichtigen wäre, das GLOBLE-MS-Modell zu nutzen, bei dem der Anteil der früh- und spätreplizierten DNA zelllinienspezifisch ist.

Extrapolation des Überlebens nach Photonenbestrahlung zu hohen Dosen

Zur Vorhersage des Überlebens nach Ionenbestrahlung durch das LEM wird eine Extrapolation der Dosiseffektkurven nach Photonenstrahlung zu hohen Dosen benötigt. Für asynchrone Zellen ist dies durch das LQL-Modell realisiert, wobei die Übergangsdosis empirisch bestimmt wird [74]. Die Extrapolation zu hohen Dosen Photonenstrahlung ist ebenfalls für die Hypofraktionierung, Bestrahlung mit hohen Einzeldosen (≈ 60 Gy) interessant [9], [10]. Für die Extrapolation der Dosiseffektkurve synchroner Zellen zu hohen Dosen gab es in diesem Kontext bisher keinen Ansatz. In dieser Arbeit werden zu diesem Zweck zwei Methoden vorgestellt, Extrapolation-A und -B. In diesem Kapitel wird die Problematik der Extrapolation von Dosiseffektkurven nach Photonenbestrahlung zu hohen Dosen hin dargelegt.

Viele Arbeiten zeigen, dass die Beschreibung von Zellüberlebenskurven durch das LQ-Modell nur eine Näherung darstellt. Innerhalb eines Übergangsbereichs wird ein Übergang von kleinen α/β -Verhältnissen zu großen sichtbar. Diese Tatsache erschwert unter anderem die Extrapolation der Dosiseffektkurve zu hohen Dosen [5]–[10], [73]. Das LEM [11] benutzt das LQL-Modell um die Dosiseffektkurven anzunähern. Eine Betrachtung unterschiedlicher Zellexperimente zeigt, dass das LQL-Modell in den meisten Fällen eine gute Näherung ist [8]. Für die Anwendung des LQL-Modells wird die Übergangsdosis benötigt, welche angibt, ab welcher Dosis das LQ-Modell in die lineare Form übergeht. Für Anwendungen mit dem LEM existiert eine empirische Methode zur Berechnung der Übergangsdosis für asynchrone Zellkulturen aus den LQ-Parametern [74]. Eine umfassende mechanistische Erklärung des Übergangs gibt es jedoch bisher nicht. Die Arbeiten von Skarsgard [5], [6] und Hawkins [7] zeigen, dass ein Grund für diesen Übergang die heterogenen Radiosensitivitäten der Subpopulationen von asynchronen Zellkulturen sind. Die Untersuchung in Kapitel 4.1.3 greifen diesen Ansatzpunkt auf. Es werden jedoch im Gegensatz zu den Arbeiten von Skarsgard und Hawkins nicht nur zwei Subpopulationen sondern eine kontinuierliche Verteilung betrachtet. Der Nachteil dabei ist jedoch, wie in den Versuchen mit synchronen Zellen nach Photonenbestrahlung gezeigt, dass es bei der Beschreibung der Subpopulationen systematische Unsicherheiten auftreten. Das GLOBLE-Modell kann den Übergang von kleinen zu größeren α/β -Verhältnissen der asynchronen Zellpopulation reproduzieren. Laut den Ergebnissen von Skarsgard [5], [6] und Hawkins [7] scheint es, dass die Annäherung der asynchronen Population durch zwei Subpopulationen die Überlebenskurven ausreichend gut beschreibt. Die detaillierte Aufspaltung nach Subpopulationen scheint somit nicht erforderlich. Der Vorteil des GLOBLE-Modells hingegen ist, dass nur drei freie Parameter benötigt werden um das Überleben zu beschreiben, während die Methode Skarsgard und Hawkins fünf benötigt.

Die Arbeiten von Skarsgard und Hawkins gehen zunächst davon aus, dass die resistente Subpopulation immer resistenter ist als die sensitive, indem jeweils die α - und β -Parameter der resistenten Population kleiner sind als die der sensitiven. Einige Zelllinien zeigen jedoch eine Überschneidung der beiden Subpopulationen, sodass eine im Niedrigdosisbereich resistent ist und die andere im Hochdosisbereich [6]. Weiterhin zeigt die Arbeit von Hawkins, dass das α/β -Verhältnis der asynchronen Zellpopulation größer ist als das der einzelnen Subpopulationen. Die Vorhersagen durch das GLOBLE-Modell zeigen jedoch, dass sich für viele Zelllinien die Überlebenskurven einzelner Zellpopulationen schneiden. Am deutlich-

ten ist das aus der Kreuzung der Überlebenskurven von Zellen in G1- und S-Phase zu sehen. Weiterhin zeigt das GLOBLE-Modell, dass das α/β -Verhältnis der asynchronen Zellpopulation eher dem Mittelwert der Subpopulationen entspricht (Abb. 18e).

Das GLOBLE-Modell liefert eine mögliche mechanistische Erklärung für den Zusammenhang zwischen den LQ-Parametern und der Übergangsdosis von Zellüberlebenskurven (Kap. 4.1.3). Da die Übergangsdosis ein wichtiger Parameter für die LEM-Vorhersagen ist und bisher nur empirisch angenähert werden konnte, ist dies eine große Neuerung. Mit dieser Methode kann die Übergangsdosis bestimmt werden, bei der Überlebenskurven innerhalb des LQL-Modells von einer LQ-Form in eine rein lineare Form übergehen. Der bisherige empirische Zusammenhang von Friedrich et al. [74] ist $D_t = 4 \text{ Gy} + 1.1 \cdot \alpha/\beta$, mit der Übergangsdosis D_t und den LQ-Parametern α und β . In dieser Arbeit wurde der Zusammenhang $D_t = 4.3 \text{ Gy} + 0.6 \cdot \alpha/\beta$ hergestellt und ist damit dem empirischen Zusammenhang sehr ähnlich.

Das GLOBLE-Modell sagt voraus, dass Zellen in der G1-Phase resistenter gegenüber hohen Dosen Photonenstrahlung sind als die in S-Phase. Dadurch inspiriert entstand die in Kapitel Material und Methoden beschriebene Extrapolation-A des Überlebens nach Photonenbestrahlung zu hohen Dosen. In Kapitel 4.1.4 wird ein Experiment gezeigt, um die relative Kreuzung der Radiosensitivitäten mit synchronen CHO-Zellen zu messen. Die Messungen ergaben, dass sich die Überlebenskurven synchroner Zellen in G1- und S-Phase nicht schneiden. Ferner ergaben die Analysen, dass die Überlebenskurven synchroner Zellen selbst dem LQL-Modell folgen und innerhalb der Messgenauigkeiten die gleiche maximale Steigung aufweisen. Die Arbeiten von Skarsgard [5], [6] und Hawkins [7] legen jedoch nahe, dass Überlebenskurven synchroner Zellen eine reine LQ-Form haben sollten. Es ist denkbar, dass der Übergang zu größeren α/β -Verhältnissen auf einem Restanteil resistenter Zellen beruht; da jedoch Zellen in S-Phase bereits die resistente Population darstellen, ist nicht ersichtlich um welche Zellen es sich dabei handeln könnte. Die vorhergesagte Kreuzung der Radiosensitivitäten von Zellen in G1- und S-Phase bleibt weiterhin ein interessanter Aspekt der Extrapolation von Dosiseffektkurven. Zellen in S-Phase reagieren empfindlicher auf Ionenstrahlung als die in G1-Phase [17]. Da Ionenstrahlung mit hohen lokalen Dosen in Verbindung gebracht wird, kann diese Vorhersage bei noch höheren Dosen eintreten. Außerdem zeigen die Ergebnisse von Skarsgard [6], dass der Übergang von einer LQ-förmigen Überlebenskurve in eine lineare auch damit verträglich ist, dass Subpopulationen nicht durchgehend resistent oder sensitiv sein müssen, sondern ihr Rollen dosisabhängig wechseln.

Eine Betrachtung der Überlebenskurven synchroner Zellen nach Photonenbestrahlung (Kap. 4.1.4) zeigt, dass das GLOBLE-Modell das Überleben der Zellen in G1-Phase überschätzt und das der in S-Phase unterschätzt. Daraus entsteht der Eindruck, dass die relative Anzahl der DNA-Schäden proportional zum Strahlungseffekt ist. Dieser Ansatz wird im GLOBLE-scale-Modell aufgegriffen. Die Überlegung ist, dass Zellen in der späten S-Phase (bei gleicher Dosis) doppelt so viel DNA und damit doppelt so viele DNA-Schäden haben wie die Zellen in G1-Phase. Da sie jedoch über den doppelten Chromosomensatz verfügen, kann die Wirkung eines beschädigten DNA-Abschnitts potenziell durch das unbeschädigte Schwesterchromatid kompensiert werden. Diese Überlegungen motivieren die Extrapolation-B. Im Gegensatz dazu geht das GLOBLE-Modell davon aus, dass die totale Anzahl der DNA-Schäden proportional zum Effekt ist. Auf den ersten Blick scheinen die Daten mit dieser Vorhersage des GLOBLE-Modell nicht verträglich zu sein. Die Extrapolation der Überlebenskurven zu hohen Dosen durch das GLOBLE-scale Modell in Kapitel 4.1.4 zeigt jedoch keine wesentlich besseren Ergebnisse als das GLOBLE-Modell. Einerseits sagt

das GLOBLE-scale-Modell keine Kreuzung der Überlebenskurven von Zellen in G1- und S-Phase voraus, was den systematischen Verlauf der Daten besser beschreibt als das GLOBLE-Modell. Andererseits beschreibt das GLOBLE-scale-Modell die Steigungen der Überlebenskurven bei hohen Dosen schlechter als das GLOBLE-Modell. Die Vorhersagen des Überlebens synchroner Zellen nach Ionenbestrahlung mit der Extrapolation-A führen zu einer besseren Beschreibung der Daten als mit Extrapolation-B. Daraus wird gefolgert, dass eine rein empirische Extrapolation der Dosiseffektkurven synchroner Zellen zu hohen Dosen (was Extrapolation-B entspricht) den Einfluss des Zellzyklus auf das Überleben nicht ausreichend beschreiben kann. Ferner zeigt dies, dass die Vorhersagen des GLOBLE-Modells bezüglich der Kreuzung der Überlebenskurven von Zellen in G1- und S-Phase im untersuchten Parameterraum zwar nicht bestätigt wird. Die Extrapolation zu hoch-LET-Strahlung führt jedoch zu einer guten Übereinstimmung der LEM-Vorhersagen mit den Daten.

Da das GLOBLE-Modell und das LEM die gleiche Definition von DNA-Schadensklassen nutzen, würde man erwarten, dass keine heuristische Extrapolation der Dosiseffektkurve notwendig ist, sondern dass sich die Letalitäten der Schäden direkt im LEM nutzen lassen. Die hier untersuchten Daten deuten darauf hin, dass alle drei betrachteten GLOBLE-Varianten die untersuchten Überlebenskurven nach Photonenstrahlung nur bis ca. 15 Gy beschreiben können. Dadurch würde die Zuweisung der GLOBLE-Letalitäten zu den iDSB und cDSB im LEM zu einer Überschätzung der Strahlenwirkung führen. Die Dissertation von Lisa Herr [72] befasste sich bereits mit dieser Problematik. Auch in dieser Arbeit konnte keine mechanistische Erklärung für diese Diskrepanz gefunden werden. Es wird jedoch eine Methode vorgestellt (Extrapolation-A), die diese Lücke für synchrone Zellen soweit schließt, dass eine Verknüpfung des GLOBLE-Modells mit dem LEM möglich ist. Der genaue mechanistische Zusammenhang hinter der Übergangsdosis des Übergangs von kleinen zu großen α/β -Verhältnissen ist im Zusammenhang des LEM seit dessen Einführung ungeklärt. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Heterogenität der Subpopulationen eine teilweise, jedoch keine vollständige Erklärung liefert. Damit wird in dieser Arbeit ein erster mechanistischer Erklärungsansatz für den Zusammenhang zwischen der Übergangsdosis und dem α/β -Verhältnis gegeben.

Überleben synchroner Zellen nach Ionenbestrahlung

Die LEM-Überlebensvorhersage, basierend auf dem Überleben nach Photonenbestrahlung, wird bisher nur für asynchrone Zellen durchgeführt. Als technischer Aspekt vorweg soll erwähnt werden, dass das LEM die Überlebenskurve nach Photonenstrahlung in Form des LQL-Modells benötigt, um Vorhersagen für Ionenstrahlung treffen zu können. Zur Beschreibung der Strahlenwirkung von Photonen wird in dieser Arbeit das GLOBLE-Modell benutzt. Aus den Vorhersagen des GLOBLE-Modells werden mit der in Kapitel 3.1.2 entwickelten Methoden die LQL-Parameter berechnet. In dieser Arbeit wird gezeigt, dass es damit möglich ist, das Überleben synchroner Zellen nach Ionenstrahlung vorherzusagen. Eine wichtige Erkenntnis dabei ist, dass dieser Modellrahmen die Änderung der relativen Sensitivität der Zellen in S-Phase korrekt beschreibt; während diese resistent (im Vergleich zu Zellen in G1-Phase) gegenüber Photonenstrahlung sind, sind sie sensibler als Zellen in G1-Phase gegenüber Ionenstrahlung. Ebenfalls wird die Größenordnung der Überlebensvariation im Laufe des Zellzyklus beschrieben. Die Fähigkeit des Modells, diese Vorhersage mit relativ hoher Genauigkeit machen zu können, zeigt die Stärke der mechanistischen Grundlage des LEM. Die empirische Beobachtung der Sensitivierung der Zellen gegen-

über Ionenstrahlung in der S-Phase fließt nicht unmittelbar in das Modell ein, sondern die Extrapolation des Überlebens nach Photonenbestrahlung. Deshalb könnte naiv erwartet werden, dass die Zellen in der S-Phase, die resistenter gegenüber Photonenstrahlung sind, ebenfalls resistenter gegenüber Ionenstrahlung sind. Dass das LEM die Umkehr der Radiosensitivität von Zellen in der S-Phase relativ zu Zellen in der G1-Phase richtig wiedergibt, ist es ein Hinweis, dass die relevanten Effekte bezüglich Zellkerngröße, Reparaturfähigkeit, und Schadensspektrum im LEM angemessen behandelt werden. Diese einzelnen Aspekte werden im Folgenden genauer ausgeführt.

Bei einer generellen Betrachtung des LET-Einflusses auf das Zellüberleben für therapierelevante Dosen⁵ finden sich zwei Extremfälle: nach niedrig-LET-Bestrahlung bekommen alle Zellen Schäden und es ist im Wesentlichen die Reparaturkapazität der Zelle für das Überleben entscheidend. Auf die Modellierung dieses Aspektes im Zusammenhang mit dem Zellzyklus wird bereits in Kapitel 4.1.1 eingegangen. Für hoch-LET-Strahlung, im so genannten Overkillbereich, werden nicht alle Zellen von Ionen getroffen, in den getroffenen Zellen wird jedoch so viel Dosis deponiert, dass die biologischen Schäden mit großer Wahrscheinlichkeit zum Zelltod führen [104], [105]. An dieser Stelle ist die sogenannte Trefferstatistik relevant. Dabei spielt die Größe des Targets eine Rolle. Im Zusammenhang mit dem Zellzyklus ist dies relevant, da sich die DNA während der S-Phase verdoppelt, wodurch das Target größer und die Zellen damit sensibler werden [17]. An dieser Stelle sind die Überlebenskurven nach Nickel- und Uranstrahlung interessant. Diese Strahlenqualität liegt deutlich im Overkillbereich, womit sie zwar nicht therapierelevant ist, sich aber dazu eignet, um die LEM-Beschreibung der geometrischen Eigenschaften der Zelle zu prüfen. Der Vergleich des LEM mit den Daten dieser Strahlenqualitäten (Nickel-, Uranionen, Fig. 25c, 25d) zeigt gute Übereinstimmung während der G1- und Ende S-Phase. Während der frühen/mittleren S-Phase zeigen die Daten jedoch eine höhere Sensitivität als die LEM-Vorhersage. Das kann darauf hindeuten, dass die zeitliche Größenzunahme des Zellkerns während der S-Phase nicht linear ist. Unter der Annahme, dass die Versuche Ni089 und U130 unter Overkill Konditionen durchgeführt wurden, würde man keinen Einfluss bezüglich der Wahl der Extrapolation (-A oder -B) erwarten. Der dennoch beobachtete Unterschied könnte darauf zurückzuführen sein, dass solche Ionenspuren nicht perfekt auf einen Punkt fokussiert sind, sondern eine laterale Ausdehnung haben. Dadurch deponieren nah am Zellkern vorbei fliegende Ionen Energie im Zellkern, welche formal einem niedrigeren LET entspricht und damit nicht unbedingt zum Zelltod führen muss.

Die therapeutisch relevanten Strahlenqualitäten erstrecken sich normalerweise über einen weiten LET-Bereich (zwei- bis dreistelliger keV/μm Bereich). Dadurch ist es entscheidend, nicht nur die zwei Extremfälle zu betrachten, sondern auch den Übergangsbereich. Die Überlebenskurven nach Kohlenstoffbestrahlung (C045 und C110) liegen in etwa in diesem Bereich. Hier erwartet man eine Mischung der zuvor erwähnten Effekte: zum einen ist die Reparaturkapazität der Zellen relevant, welche sich im Laufe des Zellzyklus ändert, zum anderen die Trefferwahrscheinlichkeit, welche mit zunehmender DNA-Menge größer wird. Damit ist verbunden, dass sich zum einen die Verfügbarkeit des Reparaturweges HR und die Resistenz der Zellen erhöht, zum anderen wird es wahrscheinlicher, dass Zellen aufgrund der Größenzunahme getroffen werden. Ebenfalls werden mit zunehmendem DNA-Gehalt mehr Schäden bei gleicher Dosis induziert. Nach Extrapolation-A reduziert dies das Zellüberleben. Ebenfalls muss aber berücksich-

⁵ Typischerweise 2 Gy Photonen, je nach Behandlungsplan die gleiche physikalische oder biologisch äquivalente Dosis bei Ionen

tigt werden, dass das induzierte Schadensspektrum durch Kohlenstoffionen ein anderes ist als das durch Photonen, sodass mehr cDSB induziert werden, denen gegenüber die Zellen der S-Phase keinen Vorteil mehr haben. An dieser Stelle ist es wichtig die unterschiedlichen Einflüsse, die zum Teil gegenläufiger Natur sind, korrekt zu gewichten. Da das LEM die systematische Zeitabhängigkeit des Überlebens synchroner Zellen nach Ionenbestrahlung richtig wiedergibt, kann gefolgert werden, dass das LEM eine gute Näherung darstellt. Aufgrund der Abweichungen in der vorhergesagten Genauigkeit ist jedoch ersichtlich, dass es weiterer Optimierungen bedarf.

Die Subpopulationen, welche einer exponentiell wachsenden Zellkultur angehören, weisen unterschiedliche Radiosensitivitäten und unterschiedliche α/β -Verhältnisse auf [5]–[7]. Abbildung 18 zeigt die GLOBLE-Modellvorhersage der Häufigkeitsverteilung von α, β -Parameter einer asynchronen Zellpopulation. Es werden α/β -Verhältnisse im Bereich von null bis hin zum fast doppelten Wert der asynchronen Zellpopulation vorhergesagt. Die RBE nach Ionenbestrahlung hängt im allgemeinen von den jeweiligen α/β -Verhältnissen ab. Daher ist es von Interesse, zu untersuchen, ob das mittlere α/β -Verhältnis eine angemessene Beschreibung der asynchronen Zellpopulation zur RBE-Vorhersage darstellt. Die entsprechende Untersuchung zeigt (Abb. 27), dass die Miteinbeziehung des Zellzyklus in die Vorhersagen die RBE_{10} für CHO-Zellen überschätzen. Für V79-Zellen werden für beide Fälle ähnliche Werte vorhergesagt. Bei dieser Untersuchung handelt es sich um einen Modell-Modell-Vergleich. Die konventionelle Vorhersage wurde bereits dahingehend optimiert, sodass sie RBE-Vorhersagen treffen kann [14], [15]. Es muss beachtet werden, dass die verwendete Methode der Extrapolation der Dosiseffektkurve nach Photonenbestrahlung eine erste Näherung ist und den Effekt nach Ionenbestrahlung zum Teil überschätzt. Die Extrapolation bedarf weiterer Optimierung, sodass das Zellzyklusspezifische Überleben mit einer höheren Genauigkeit vorhergesagt werden kann. Demzufolge ist das LEM in der Lage die RBE von Ionenstrahlung synchroner, bzw. nach dem Zellzyklus aufgelöster asynchroner Populationen vorherzusagen. Die Vorhersage der RBE_{10} reparaturdefizienter und -kompetenter Zellen (Kap. 4.1.6) bestätigt dies. Es gibt keinen offensichtlichen Grund zu der Annahme, dass die bisherige LEM-Vorhersage der RBE von Ionenstrahlung aus Überlebenskurven asynchroner Zellen wichtige Effekte vernachlässigt. Somit ist die Miteinbeziehung des Zellzyklus für diese Vorhersagen möglich aber nicht zwingend erforderlich.

4.2.2 Einfluss von DNA-Reparaturdefiziten auf das Zellüberleben

Die in dieser Arbeit sowie vorhergehenden Arbeiten vorgestellten Methoden zum GLOBLE-Modell und LEM [3], [4], [11]–[15], werden kombiniert um das Überleben asynchroner reparaturdefizienter Zellen nach Photonen und Ionenbestrahlung vorherzusagen. Die Vorhersage des Überlebens reparaturdefizienter Zellen wurde bisher nur für synchrone Zellen nach Photonenbestrahlung von Hufnagl et al. [4] vorgestellt. Um Vorhersagen für asynchrone reparaturdefiziente Zellen treffen zu können, wird der hier vorgestellte Zusammenhang zwischen dem Überleben synchroner und asynchroner Zellen ausgenutzt (Kap. 4.1.2). Unter Zuhilfenahme des LEM können auch entsprechende Vorhersagen für Ionenbestrahlung getroffen werden (Kap. 4.1.6). Trotz systematischer Unsicherheiten der Vorhersagen können die Daten von Takahashi et al. [99] in guter Näherung beschrieben werden. Dabei lässt sich dieser Datensatz, bestehend aus Überlebens- und RBE-Kurven nach Photonen- und Ionenbestrahlung reparaturkompetenter und -defizienter Zellen, im Wesentlichen durch zwei freie GLOBLE-Modellparameter charakterisieren. Wenn die Überlebenskurven reparaturkompetenter und -defizienter Zellen nach Photonenbestrahlung für die

Modellanpassung benutzt werden, lassen sich die RBE der Ionenbestrahlung relativ gut vorhersagen. Es ist möglich, die Vorhersagen auch alleine auf Grundlage der Wildtyp-Zellüberlebenskurve zu treffen. Die Vorhersagen sind dann zwar mit größeren Unsicherheiten verbunden, die wichtigen systematischen Effekte werden aber im Wesentlichen wiedergegeben.

Die Vorhersage der RBE von reparaturdefizienten Zellen durch das LEM ist an sich keine Neuerung, da das LEM auf alle Zelllinien angewendet werden kann. Eine entsprechende Vorhersage, ohne Zuhilfenahme des GLOBLE-Modells, würde acht anstelle von zwei freien Parameter erfordern. Weiterhin würden viele der mechanistischen und interpretativen Eigenschaften wegfallen. Die Neuerung in dieser Arbeit ist, dass die RBE für spezifische Mutationen vorhergesagt werden kann, wodurch sich die Anzahl der freien Parameter verringert. Aus diesen Ergebnissen wird geschlossen, dass die im GLOBLE-LEM-Modellrahmen betrachteten Effekte bezüglich der Verfügbarkeit von DNA-Reparaturwegen, die DSB-Clusterung auf der μm -Skala, die Beschreibung der lokalen Dosisverteilung sowie der Zusammenhang zwischen DNA-Schadensmuster und Effekt ausschlaggebend sind um das Zellüberleben zu beschreiben. Im Zusammenhang mit dem Überleben reparaturdefizienter Zellen gibt es Hinweise darauf, dass die cDSB durch alternative Reparaturwege repariert werden. Alternative Reparaturwege werden innerhalb des GLOBLE-Modells nicht explizit betrachtet, sondern nur die Hauptreparaturwege NHEJ und HR. Der MEF-double-KO-Zelllinie stehen diese zwei Reparaturwege nicht zur Verfügung, entsprechend wird angenommen, dass die iDSB mit der gleichen Letalität assoziiert sind wie die cDSB. Mit dieser Annahme werden die Überlebenskurven der double-KO-Zelllinie innerhalb der Fehlerbalken durch das GLOBLE-Modell beschrieben. In Abwesenheit von NHEJ und HR stehen nur noch die alternativen Reparaturwege zur Verfügung. Das ist ein Hinweis darauf, dass reparaturkompetente Zellen die cDSB mit den alternativen Reparaturwegen verarbeiten. Eine ähnliche Überlegung gab es bereits in der Arbeit von Hufnagel et al. [4]. Dabei wird dargelegt, dass die Rolle der alternativen Reparaturwege unklar ist und gefolgert, dass weder NHEJ noch HR die cDSB korrekt reparieren können.

4.2.3 Vergleich zu anderen Modellen

Der Vorteil der Beschreibung des Zellüberlebens durch das GLOBLE- gegenüber dem LQ-Modell beruht auf den prädiktiven und interpretativen Eigenschaften. Aufgrund der starken Vereinfachung des Modells lassen sich der Einfluss des Zellzyklus sowie der von Reparaturdefiziten auf das Überleben relativ einfach nachbilden. Daraus resultieren jedoch Ungenauigkeiten in der Beschreibung der Daten. Für reinen Beschreibung der Daten ist das LQ-Modell jedoch besser geeignet.

Die relevante Größenskala der DSB-Clusterung sowie die Einteilung der DSB in zwei, Klassen wird oft im Zusammenhang mit dem GLOBLE-Modell und LEM diskutiert [70], [72], [106]. Einige Arbeiten [18], [19], [22], [23] vertreten die Hypothese, dass die DSB-Clusterung auf der nm-Skala biologisch relevant ist. Die hier untersuchten Daten stützen die Annahme der besonderen Relevanz der DSB-Clusterung auf der Ebene der Chromatin-Loops, da die untersuchten Effekte durch diese Annahme qualitativ und oft quantitativ beschrieben werden können. Das MKM verwendet ebenfalls eine Klassifizierung von zwei Schadensarten auf der μm -Skala. Das BIANCA-Modell [69] wiederum befasst sich mit der dazwischenliegenden Größenskala, der Clusterung von Schäden im Bereich von kbp. Eine ausführlichere Diskussion dessen findet sich in Kapitel 5.2 im Zusammenhang mit den Untersuchungen der amorphen Bahnstruktur.

In der Arbeit von Hufnagl et al. [4] wird dargelegt, dass das GLOBLE-Modell das erste radiobiologische Modell ist, welches die DNA-Reparaturwege quantitativ mit dem Zellüberleben nach Photonenbestrahlung in Verbindung bringt. In der Arbeit von McMahon et al. [71] wird ein Modell vorgestellt, welches die DNA-Schadensinduktion nach Photonenbestrahlung, Reparaturwegwahl und Reparaturgüte in einem zum GLOBLE-Modell ähnlichen Konzept mit dem Überleben in Verbindung setzt. Im Gegensatz zum GLOBLE-Modell wird den DNA-Schäden jedoch keine Inaktivierungswahrscheinlichkeit zugewiesen, sondern Induktionsraten chromosomaler Aberrationen werden mit kombinatorischen Methoden vorhergesagt. Aus der Anzahl und der Art der chromosomalen Aberrationen wird schließlich das Zellüberleben bestimmt. Für den Zusammenhang zwischen chromosomalen Aberrationen und Zellüberleben werden heuristische Überlegungen herangezogen, welche jeweils nur für Zellen in G1- oder G2-Phase gelten. Im Gegenzug kann das GLOBLE-Modell das Zellüberleben für alle Zellzyklusphasen mit den gleichen Annahmen vorhersagen. Während das GLOBLE-Modell nur das Zellüberleben betrachtet, werden bezieht das Modell von McMahon et al. weitere biologischen Endpunkte, wie Reparaturkinetiken und chromosomale Aberrationen, mit ein. Für klinische Anwendungen ist es jedoch noch nicht ausgereift [71].

Es gibt Ansätze [22], [23], [57], [78], das Zellüberleben nach Bestrahlung mit hoch-LET-Strahlung mit *ab initio* Modellen zu simulieren. Dabei werden die initialen DNA-Schäden mit vierdimensionalen Transportmodellen bestimmt. Das MSA-Modell weist einer bestimmten Schadensart direkt eine Zellinaktivierungswahrscheinlichkeit zu [22], [23]. Andere Modelle versuchen, die DNA-Reparaturen auf molekularer Ebene zu simulieren [57], [78]. Dieses Vorgehen erlaubt es, Erkenntnisse aus vielen experimentellen Quellen miteinander in Verbindung zu bringen und die molekularen Prozesse im Detail nachzubilden. Damit konnte bisher jedoch kein Zellüberleben vorhergesagt werden. Weitere Nachteile dieses Vorgehens sind, dass eine höhere Auflösung der Simulation nicht notwendigerweise zu genaueren Vorhersagen führt, sowie dass nicht alle simulierten Zwischenschritte experimentell bestätigt werden können. Weiterhin werden für diese Modelle sehr genaue und zelllinienspezifische Informationen benötigt, wodurch diese nur auf bestimmte Zelllinien anwendbar sind.

Das Neue in dieser Arbeit ist, dass die mechanistische Verbindung zwischen Reparaturwegverfügbarkeit, Reparaturgüte und Zellüberleben konsistent für niedrig- und hoch-LET-Strahlung angewendet werden kann. Die anderen Modelle, welche die gleichen Aspekte betrachten, beschränken sich meistens auf niedrig- oder hoch-LET-Strahlung. In der Arbeit von Takahashi et al. [99] ist eine Schlussfolgerung, dass der NHEJ-Reparaturweg insgesamt wichtiger für das Zellüberleben ist als HR. In dieser Arbeit wird gezeigt, dass das GLOBLE dies richtig vorhersagen kann. Ebenfalls wird die RBE von reparaturdefizienten Zellen nach Ionenbestrahlung durch LEM reproduziert.

Radiobiologische Modelle, wie das RMR-Modell [66], LPL-Modell [68] und MKM [67], modellieren ebenfalls den Einfluss von DNA-Reparatur auf das Zellüberleben. Es werden Reparaturkinetiken von DNA-Schäden betrachtet, darüber kann das Zellüberleben fraktionierter Bestrahlungen, auch Dosis-Zeit-Effekte genannt, vorhergesagt werden. In der Arbeit von L. Herr [72] wird gezeigt, dass Dosis-Zeit-Effekt auch in GLOBLE und LEM für niedrig- und hoch-LET-Strahlung berücksichtigt werden kann. Dafür werden Reparaturkinetiken ausgewertet, um die Wahrscheinlichkeit zu bestimmen, mit der zwei DNA-Schäden interagieren können. Damit können Fraktionierungsschemata zur Behandlungsplanung modelliert werden. Die Reparaturwege selbst werden jedoch nicht genauer betrachtet. Die hier vorgestellten Analysen befassen sich hingegen mit der Fidelität von DNA-Reparaturwegen, ohne Dosis-Zeit-Effekte

zu berücksichtigen. Daher ist ein Vergleich des zellzyklusspezifischen GLOBLE-Modells [4] mit den zuvor genannten nur bedingt möglich. Eine Erweiterung des GLOBLE-Modells, welche Zeit-Dosis-Effekte analog zu Ref. [72] mit DNA-Reparaturwegen kombiniert, ist denkbar.

Bei der Bandbreite der vorgestellten Modelle zur Beschreibung der Wirkung von Ionenstrahlen auf Zellen kann das GLOBLE-Modell und das LEM als semi-mechanistisch eingestuft werden. Diese Modelle wurden so entwickelt, dass die für das Zellüberleben relevanten Effekte mechanistisch modelliert werden. Gleichzeitig werden die betrachteten Effekte abstrahiert und vereinfacht behandelt. Dafür wird auf empirischer Befunde zurückgegriffen. Dadurch erhält das GLOBLE-Modell und das LEM ihren empirischen Charakter. Dies macht es möglich, Phänomene zu berücksichtigen, die empirisch bekannt sind, zu denen aber kein mechanistisches Modell vorliegt. Insgesamt sollen so alle relevanten Effekte berücksichtigt werden, während die Komplexität gering gehalten wird.

Modelle wie PARTRAC, KURBUC, Geant4-DNA und MSA werden als mechanistisch betrachtet. Diese haben zum Ziel, alle beitragenden Effekte zu modellieren, ohne die Komplexität zu reduzieren. Dabei werden unter anderem Mechanismen modelliert, deren experimentelle Verifikationen fehlen. Die Konsequenz dessen ist, dass die detaillierteren Rechnungen nicht notwendigerweise zu genaueren Ergebnissen führen. In Kapitel 5.2 wird dieser Aspekt nochmals detaillierter in Bezug auf die mikroskopische Dosisverteilung diskutiert.

Ein weiterer Grund, die DSB-Reparaturwege explizit zu betrachten, ist, dass diese besonderem Interesse für die Tumorthherapie sind. Diese können als Angriffspunkte für eine Behandlung genutzt werden [60], [107]–[109]. Viele Arbeiten befassen sich mit der Erforschung von DNA-Reparaturweginhibitoren, vor allem im Zusammenhang mit ionisierender Strahlung zur Behandlung von Tumoren. Es wird angenommen, dass die höhere Resistenz der Tumore auf ihrer Reparaturfähigkeit bzw. Toleranz gegenüber DNA-Schäden beruht. Das Ziel solcher Studien ist es, die selektive Sensitivierung von Tumoren zu erforschen. Das GLOBLE-Modell kann in diesem Umfeld hilfreiche Erkenntnisse im Rahmen theoretischer Untersuchungen bringen – insbesondere in Bezug darauf, unter welchen Umständen sich ein DNA-Reparaturweginhibitor vorteilhaft auf die Therapie auswirkt. Die Tumorthherapie mit Ionenbestrahlung wird auf immer mehr Tumorarten angewendet. Eine mögliche Anknüpfung ist, dass hoch-LET-Strahlung keine Vorteile bezüglich der RBE für NHEJ defiziente Zellen liefert (Kap. 4.1.6). Mit ähnlichen Rechnungen ließe sich im Vorhinein abschätzen, welche Strahlen/Inhibitoren-Kombinationen vorteilhaft wären. In der Arbeit von Hufnagl et al. [4] wird die therapeutische Relevanz des GLOBLE-Modells über den Bezug zur Zellzyklusverteilung dargelegt. Tumorzellen in S-Phase sind meistens besonders resistent gegenüber Photonenstrahlung. Die Bestrahlung führt auch zu einer Veränderung der Zellzyklusverteilung. Die daraus resultierenden Nachteile zur Behandlung werden durch Ausnutzung der Redistribution [110]–[112] kompensiert. Die Untersuchungen in Kapitel 4.1.5 legen nahe, dass Zellen in S-Phase keine Resistenz gegenüber Kohlenstoffbestrahlung aufweisen, sodass keine resistente Subpopulation vorhanden ist.



5 Untersuchungen zur amorphen Bahnstruktur

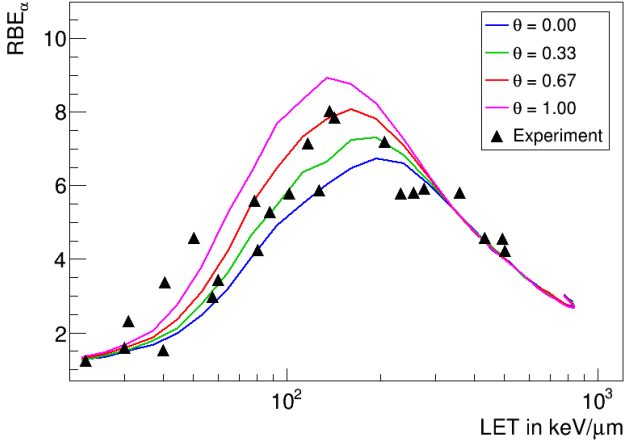
In diesem Kapitel wird die Beschreibung der amorphen Bahnstruktur, unter Berücksichtigung unterschiedlicher Mischungsverhältnisse des direkten und indirekten Effekts, untersucht. Als erstes wird der Einfluss unterschiedlicher Anteile des direkten Effekts auf die LET-abhängige RBE-Vorhersage von Kohlenstoffstrahlung im Eingangskanal untersucht. Anschließend wird die Beschreibung der DNA-Schadensclusterung auf der nm-Skala durch die amorphe Bahnstruktur analysiert. In diesem Zusammenhang wird ebenfalls darauf eingegangen, ob die amorphe Bahnstruktur die mikroskopischen Dosisdeposition ausreichend genau beschreibt oder ob detailliertere Beschreibungen, wie z. B. durch *ab initio* Modelle, notwendig sind. Abschließend wird der Beitrag der komplexen DNA-Schadenscluster auf der nm-Skala zur Strahlenwirkung diskutiert.

5.1 Ergebnisse

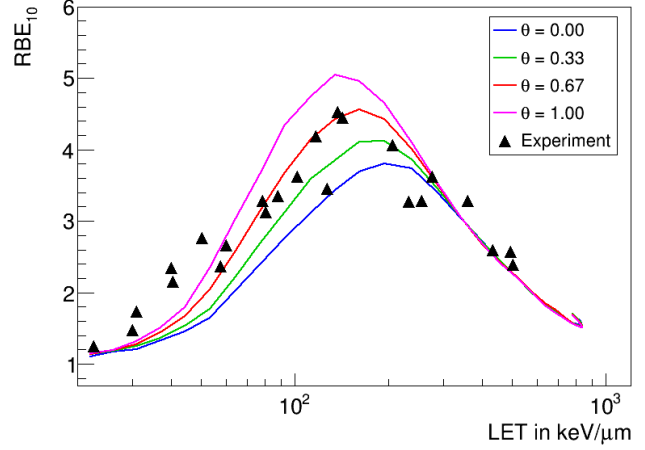
5.1.1 Einfluss des indirekten Effekts auf die RBE von Ionenstrahlung

Ein zentrales Element der Berechnung des Zellüberlebens nach Schwerionenbestrahlung durch das LEM ist die mikroskopische Dosisdeposition. Diese wird im LEM in Form einer amorphen Bahnstruktur beschrieben. Eine Untersuchung der Bahnstruktur in Ref. [34] zeigte, dass die verwendete Form, insbesondere bei Radien im Bereich von einigen nm, einen großen Einfluss auf die Ergebnisse der LEM-Vorhersage hat. Messungen [31] zeigen, dass die Dosisdeposition proportional zu $1/r^2$ für Radien r größer als 100 nm ist. Bei kleineren Radien sind Messungen experimentell nicht realisierbar. Dadurch ist eine Vielzahl von Modellen zur Beschreibung der amorphen Bahnstruktur mit den Experimenten verträglich. Die aktuell verwendete radiale Dosisverteilung im LEM (Kap. 2.3.3, Gl. 21) geht von einer $1/r^2$ -Form aus. Innerhalb eines inneren Radius r_{min} wird die Dosis als konstant angenommen und oberhalb eines maximalen Radius r_{max} fällt die Dosis auf null. Der indirekte Effekt wird berücksichtigt indem die radiale Verteilung zusätzlich mit einer zweidimensionalen Gaußverteilung gefaltet wird. Bei einer genaueren Betrachtung müsste jedoch eine Mischung der direkten- (Gl. 20) und der indirekten Dosisverteilung (Gl. 21) benutzt werden.

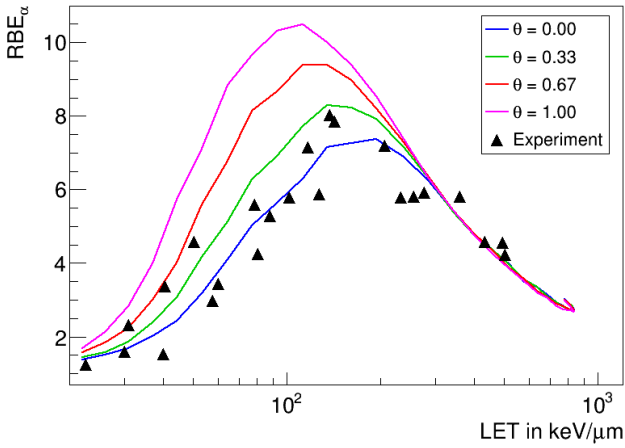
Die RBE von Kohlenstoffbestrahlung lässt sich durch die aktuelle Version des LEM im Bereich des RBE-Maximums beschreiben, welches bei der Strahlentherapie im Tumervolumen liegt. Dadurch wird eine Behandlungsplanung ermöglicht. Der Bereich des Strahls, der geometrisch vor dem Tumor liegt, wird als Eingangskanal bezeichnet. In diesem treten niedrige LET auf, deren RBE durch das LEM unterschätzt werden. Um das volle Potential der Ionentherapie nutzen zu können, müssen auch die RBE in den Bereichen außerhalb des Tumors beschrieben werden [14]. Bei der Bestimmung der RBE im gesunden Gewebe müsste weiterhin bedacht werden, dass auch andere biologische Endpunkte als das Zellüberleben für die NTCP eine Rolle spielen. In diesem Zusammenhang wird untersucht, ob eine Aufspaltung der Beschreibung des Effekts nach direktem und indirektem Anteil (Kap. 3.3.1) die zugrunde liegenden Mechanismen besser beschreibt und damit zu einer genaueren RBE-Vorhersage im Eingangskanal führt. Die radiale Dosisverteilung der direkten, indirekten und gemischten Dosisdeposition, mit dem θ -Wert = $2/3$, wird beispielhaft für Kohlenstoffionen der Energie 8 MeV/u in Kapitel 3.3.1 Abbildung 9 dargestellt. Der Einfluss verschiedener Mischungsverhältnisse des direkten und indirekten Effekts wird untersucht, indem die RBE_α und RBE_{10} als Funktion des LET für verschiedene θ -Parameterwerte ($= 0, 1/3, 2/3, 1$)



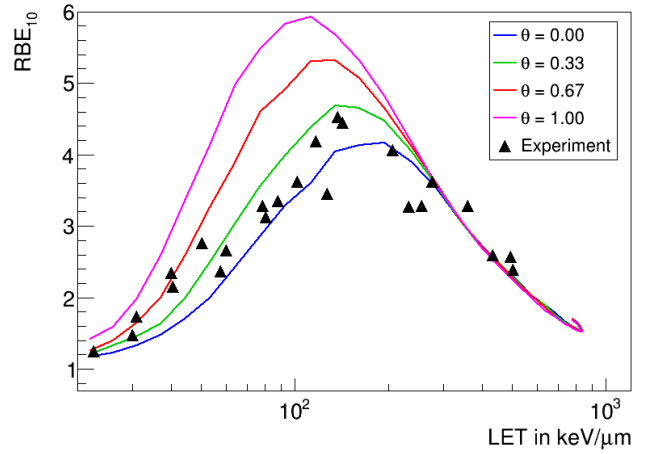
(a) RBE_α



(b) RBE_{10}



(c) $RBE_\alpha, r_c=3 \text{ nm}$



(d) $RBE_{10}, r_c=3 \text{ nm}$

Abbildung 30: Vergleich der RBE_α (a,c) und RBE_{10} (b,d) von V79 Zellen und der Vorhersage des LEM mit verschiedenen Parametern der amorphen Bahnstruktur. Für das Mischungsverhältnis des direkten und indirekten Effekts θ wird 0 (blaue Linie), $1/3$ (grüne Linie), $2/3$ (rote Linie) und 1 (magenta Linie) verwendet. Für den maximalen inneren Spurradius r_c wird in Abbildung a und b der Standardwert von 6.5 nm und für c und d $r_c = 3 \text{ nm}$ verwendet. Experimentelle Daten wurden Ref. [113] entnommen.

mit dem LEM vorhergesagt wird. Als Vergleich werden RBE-Werte aus Ref. [113] herangezogen, welche aus Überlebenskurven mit Kohlenstoff bestrahlten V79-Zellen gewonnen wurden. Dieser Datensatz wird bereits in Ref. [15] für einen anderen LEM-Daten-Vergleich verwendet, die LEM-Parameter dafür sind $\alpha = 0.184 \text{ Gy}$, $\beta = 0.02 \text{ Gy}^{-2}$, $D_t = 17 \text{ Gy}$, Kernradius $r_n = 4.7, \mu\text{m}$.

Abbildung 30a zeigt die vorhergesagte RBE_α und Abbildung 30b die RBE_{10} sowie die Daten. Diese Daten zeigen bei einem LET von ca. $140 \text{ keV}/\mu\text{m}$ das RBE-Maximum mit $RBE_\alpha = 7 - 8$ und $RBE_{10} = 3.5 - 4.5$. Für $\theta = 0$ liegt das RBE-Maximum der LEM-Vorhersage bei $LET = 200 \text{ keV}/\mu\text{m}$ mit $RBE_\alpha = 6.7$ und $RBE_{10} = 3.8$. Die LEM-Vorhersage der RBE zeigt mit zunehmendem θ eine Erhöhung der RBE eine und Verschiebung des RBE-Maximums zu niedrigerem LET. Bei einem θ -Parameter von 1 liegt das Maximum bei einem LET von ca. $135 \text{ keV}/\mu\text{m}$ mit $RBE_\alpha = 8.7$ und $RBE_{10} = 5$. Die Betrachtung der dazwischen liegenden Werte ($\theta = 1/3$ und $\theta = 2/3$) zeigt in dieser Darstellung einen in erster Näherung linearen

Verlauf. Für hohe LET ($> 300 \text{ keV}/\mu\text{m}$) sind die vorhergesagten RBE für alle θ -Parameterwerte identisch. Im Eingangskanal streift die Vorhersage der RBE_α nur das untere Ende der Daten und unterschätzt diese entsprechend. Für $\theta = 1/3$ und $\theta = 2/3$ ist RBE_α bis zu einem LET von $60 \text{ keV}/\mu\text{m}$ leicht unterschätzt, für höhere LET streuen die Daten symmetrisch um die Vorhersage. Die RBE_{10} wird durch LEM für $\theta = 0$ bis zu einem LET von ca. $200 \text{ keV}/\mu\text{m}$ unterschätzt. Für $\theta = 2/3$ findet nur noch eine Unterschätzung der Daten bis $60 \text{ keV}/\mu\text{m}$ statt, für höhere LET liegt die Kurve innerhalb der Datenpunkte.

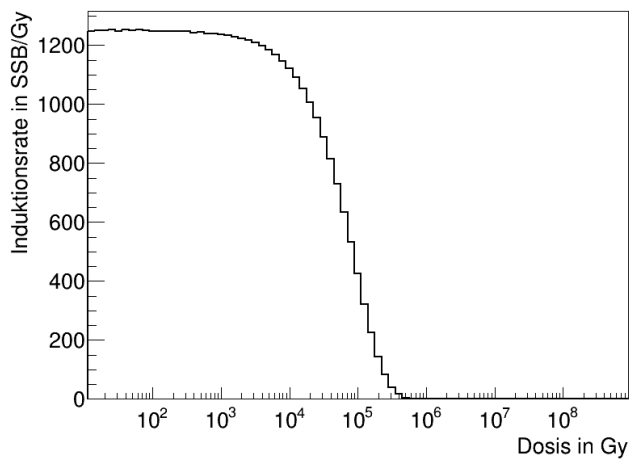
Nun wird untersucht, welchen Einfluss der innere Radius der Bahnstruktur, in Verbindung mit dem θ -Parameterwert, auf die RBE hat. Der innere Radius wird im LEM aus $r_{\min} = r_c \cdot \beta$ mit maximalem inneren Kernradius $r_c = 6.5 \text{ nm}$ und dem relativistischen β berechnet. Im Folgenden werden RBE_α und RBE_{10} mit $r_c = 3 \text{ nm}$, ansonsten unter gleichen Bedingungen wie oben, berechnet. Abbildung 30c zeigt die Vorhersage für die RBE_α und Abbildung 30d für die RBE_{10} . Nun führen höhere θ -Werte weiterhin höhere RBE-Maxima, welche zu niedrigerem LET verschoben sind. Die Änderung des r_c führt zu einer leichten Erhöhung der RBE im Maximum, verschiebt dieses jedoch nicht. Für niedrigere LET scheint die RBE_α mit $\theta = 0$ am besten beschrieben zu sein, während die anderen θ -Werte diese überschätzen. Die Daten der RBE_{10} liegen über einem LET von $60 \text{ keV}/\mu\text{m}$ zwischen den Kurven $\theta = 0$ und $1/3$, unterhalb dessen wird die RBE_{10} unterschätzt.

5.1.2 Vergleich der amorphen Bahnstruktur mit einem ab initio Modell

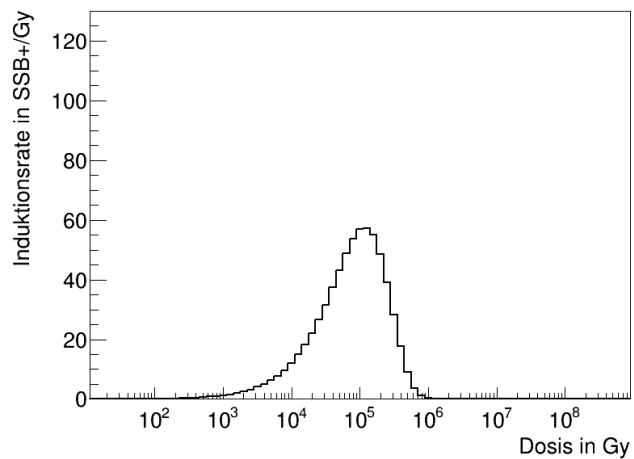
Das LEM betrachtet für seine Vorhersagen jeweils den Mittelwert der mikroskopischen lokalen Dosisverteilung von Ionenspuren auf der nm-Skala. Dahinter steht die Annahme, dass die Dosisdeposition einzelner Ionen ausreichend genau durch den Mittelwert beschrieben wird. Diese Art der Beschreibung wird als amorphe Bahnstruktur bezeichnet. Das LEM sagt das Zellüberleben ausgehend von dem DSB-Schadensmuster auf der μm -Skala vorher⁶ [3], [14]. Die amorphe Bahnstruktur und DNA-Schadensclustering auf der μm -Skala sind zwei kontrovers diskutierte Annahmen des LEM. Als Kontrast zum LEM werden veröffentlichte Ergebnisse des *ab initio* Modells entsprechend Nikjoo et al. [25], [35], [36] untersucht. Dieses befasst sich mit einer Monte-Carlo-Simulation der Dosisdeposition auf der Ebene einzelner Ionisationen und wertet DNA-Schadenscluster auf der nm-Skala aus. Die Relevanz der DNA-Schadensclustering auf der nm-Skala wird über die Schwierigkeit einer korrekten DNA-Reparatur bei zu nah aneinander liegenden Strangbrüchen motiviert [18], [19], [22], [23].

Für diesen Modellvergleich werden im ersten Schritt DNA-Schadenscluster nach Photonenbestrahlung (Kap. 3.3.2) simuliert und mit der Klassifizierung von DNA-Schäden auf der nm-Skala, von Nikjoo et al. [35], ausgewertet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 31 dargestellt. Die Induktion der SSB (Abb. 31a) und DSB (Abb. 31d) ist für Dosen bis ca. 1000 Gy konstant und entspricht den initialen Induktionsraten von 1250 SSB pro Gy und 30 DSB pro Gy . Ab 1000 Gy werden die Induktionsraten der SSB kleiner. Die Ausbeute der DSB nimmt hingegen zu, erreicht das Maximum bei ca. 100000 Gy und nimmt danach wieder ab. Diese Abnahmen sind auf die Clustering zu noch komplexeren Schäden zurückzuführen. Die Zunahme der DSB im Dosisbereich von 100 bis 50000 Gy ist mit der im LEM verwendeten DSB-Induktion identisch [81]. Für Dosen von mehr als 50000 Gy gibt es Unterschiede zu den im LEM verwendeten Ausbeuten, welche durch eine andere Art der Schadensklassifizierung beider Modelle erklärbar ist. Komplexe SSB ($\text{SSB}_c = 2\text{SSB}$ und SSB^+ , Abb. 31c, 31b) werden ab ca. 100 Gy gebildet und mit zunehmender

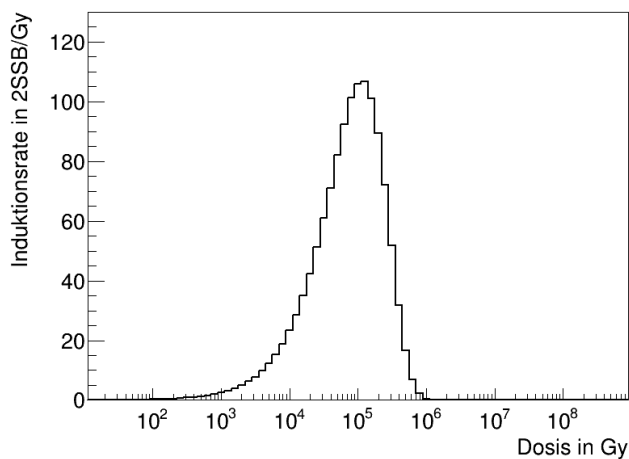
⁶ Eine Ausnahme dazu bildet die Clustering von SSB zu zusätzlichen DSB bei hohen lokalen Dosen.



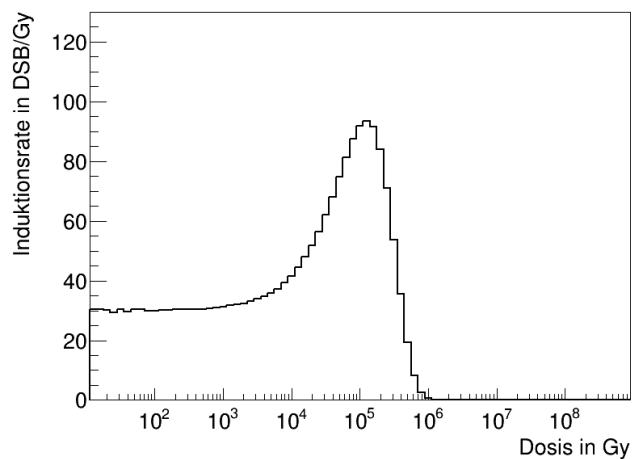
(a) SSB



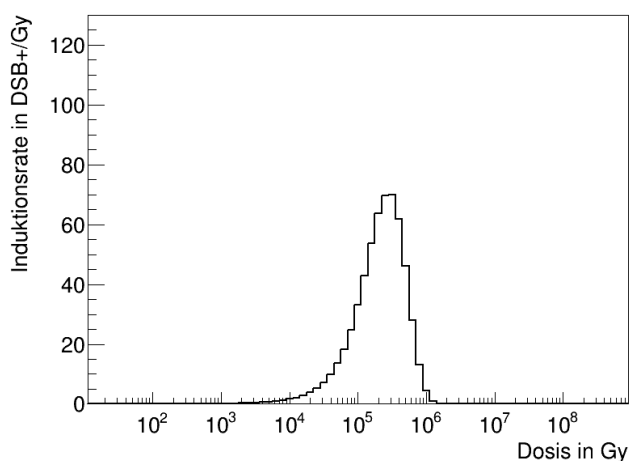
(b) SSB⁺



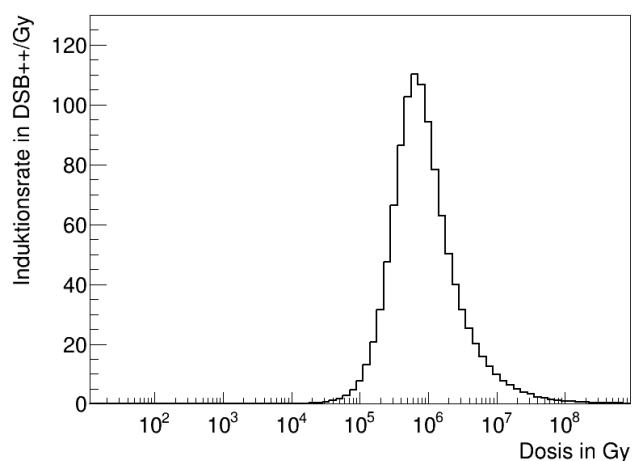
(c) 2SSB



(d) DSB



(e) DSB⁺



(f) DSB⁺⁺

Abbildung 31: Simulierte Schadensinduktionsraten – als Funktion der Dosis – durch eine zufällige Verteilung von 1250 SSB/Gy und 30 DSB/Gy auf einem virtuellen Genom und anschließender Klassifizierung der Schäden nach der Beschreibung von Nikjoo et al. [56], [114].

Dosis häufiger. Das Maximum liegt bei 100 000 Gy. Zu höheren Dosen hin wird die Induktionsrate wieder kleiner. Die DSB⁺ werden ab 1000 Gy gebildet und haben ihr Maximum bei ca. 300 000 Gy. Die Bildung der DSB⁺⁺ wird ab ca. 20 000 Gy sichtbar, die Induktionsrate hat ihr Maximum bei ca. 700 000 Gy. Für höhere Dosen fällt deren Induktionsraten fast auf null. Die Abnahme ist dadurch zu erklären, dass es sich bei den DSB⁺⁺ bereits um die komplexeste Schadensart handelt, wodurch zusätzliche Schäden zu einer Sättigung führen. Der Abfall gegen null ist definitionsbedingt, da die Induktionsrate als Anzahl der Schäden pro Dosis definiert ist. Daher können bei einer Genomlänge von 6 Gbp und einer DNA-Fragmentgröße von 54 bp nur maximal $1.11 \cdot 10^8$ Schäden pro Zelle induziert werden.

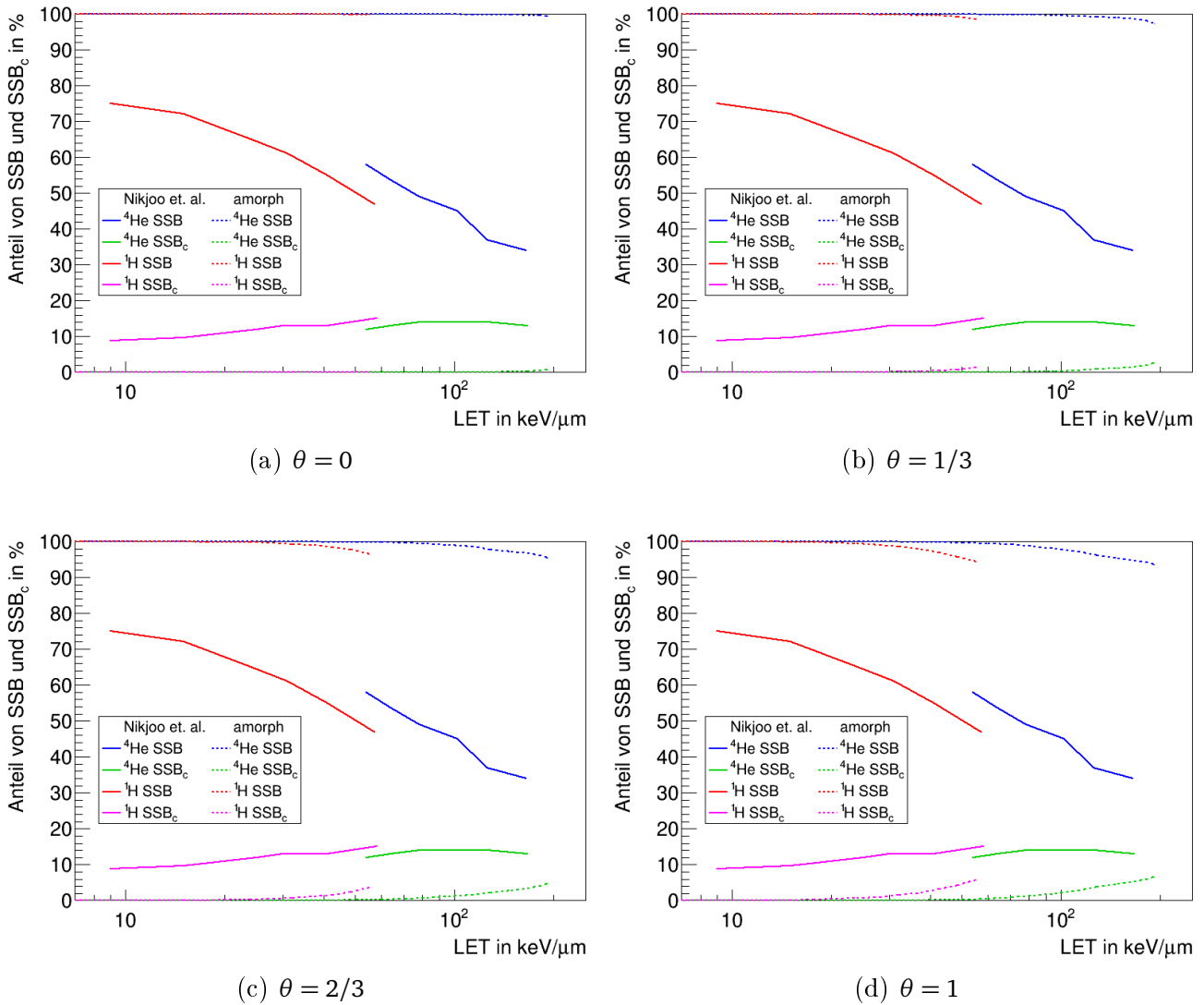


Abbildung 32: Vergleich der SSB- und SSB_c-Anteile zwischen den Daten von Nikjoo et al. aus Ref. [36] und den hier simulierten. Die durchgezogenen Linien stellen Ergebnisse aus Ref. [36] dar: Anteil der SSB nach Bestrahlung mit Helium (blau), der SSB_c (grün), Anteil der SSB nach Bestrahlung mit Protonen (rot) und SSB_c (magenta) als Funktion des LET. Die gestrichelten Linien stellen die Ergebnisse der Rechnung mit Hilfe der amorphen Bahnstruktur für verschiedene Anteile zwischen dem direkten und indirekten Effekt $\theta = 0$ (Abb. a), $\theta = 1/3$ (Abb. b), $\theta = 2/3$ (Abb. c) und $\theta = 1$ (Abb. d).

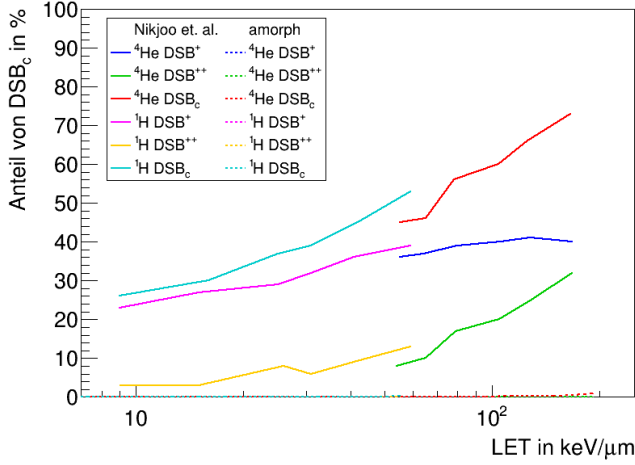
Die Ausbeuten der DNA-Schadenscluster auf der nm-Skala nach Ionenbestrahlung werden durch Auswertung der amorphen Bahnstruktur anhand der Ausbeuten nach Photonenbestrahlung für Protonen- und Helium-Bestrahlung mit unterschiedlicher Energie berechnet. Dabei werden vier verschiedene Werte für

den relativen Beitrag des direkten Effekts $\theta = 0$, $\theta = 1/3$, $\theta = 2/3$ und $\theta = 1$ verwendet. Es werden die sechs einzelnen Induktionsraten simuliert und anschließend die komplexen SSB_c und DSB_c ($= DSB^+ + DSB^{++}$) berechnet. Diese werden nach θ -Parameterwert eingeteilt und als Funktion des LET dargestellt. Als Vergleich dazu werden die Ergebnisse von Nikjoo et al. [36] herangezogen. Dabei ist zu beachten, dass nicht jeweils gleiche Werte beider Simulationen verglichen werden können. Die hier verwendete Methode simuliert die durchschnittliche Anzahl induzierter DNA-Schäden, basierend auf einem Ion pro Zelle und wertet anschließend die relativen Anteile der SSB oder DSB aus. Die Simulation von Nikjoo et al. [36] simuliert einzelne Ionisationen einer Ionenspur, welche zufällig ausgerichtete DNA-Fragmente ionisiert. Die DNA-Schadensklassen werden auf die Anzahl der betroffenen DNA-Fragmente normiert. Dabei wird die Schadensklasse *No Damage* (ND) miteingerechnet. Diese enthält DNA-Fragmente, die eine chemische Veränderung jedoch keinen Strangbruch erfahren haben. Innerhalb der hier vorgestellten Simulation existiert kein Gegenstück zu dieser Klasse. Bei Nikjoo et al. werden relative Schadensinduktionsraten auf die Gesamtanzahl der Schäden normiert. Die hier simulierten Schadensarten werden aufgrund des kleineren DSB zu SSB Verhältnis jeweils auf SSB oder DSB normiert. Bei einer Normierung auf alle Schäden würden die SSB dominieren, sodass ein Beitrag der DSB_c kaum sichtbar wäre. Eine Anpassung der Induktionsraten an die von Nikjoo et al. wäre ebenfalls möglich, würde aber das Ergebnis verfälschen, da dies keine Rechnung mehr auf den Grundlagen des LEM mehr wäre.

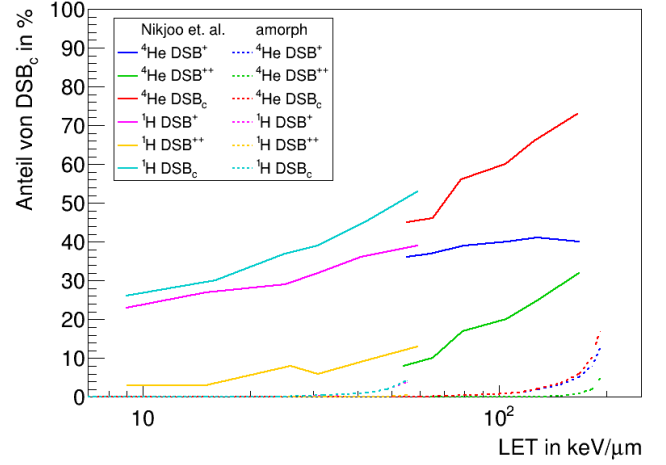
Der berechnete Anteil der SSB und SSB_c sowie die Vergleichswerte von Nikjoo et al. [36] sind in den Abbildungen 32a-d dargestellt. Die Berechnungen mit allen θ -Werten ergeben keine SSB_c für niedrige LET, sondern 100 % SSB. Hingegen zeigen die Simulationen von Nikjoo et al. einen 10-prozentigen Anteil von SSB_c für niedrige LET, welcher auf ca. 20 % für Protonen bei einem LET von 50 keV/ μ m ansteigt und so ähnlich für Helium bei 200 keV/ μ m zu sehen ist. Für niedrig-LET-Strahlung beträgt der Anteil der SSB nach Protonenbestrahlung bei Nikjoo 80 %. Für Helium liegt der höchste angegebene Wert bei 60 %. Die Berechnung mit einer 100-prozentigen Radikaldiffusion ($\theta = 0$) zeigt hier ebenfalls keine nennenswerte Induktion von SSB_c , sondern fast ausschließlich SSB. Der LET-abhängige Anstieg der SSB_c bei den Berechnungen mit $\theta = 0.67$ und $\theta = 1$ zeigt ein ähnliches Verhalten wie der von Nikjoo et al. Der Abfall der SSB-Induktionsrate findet ebenfalls in dem gleichen LET-Bereich statt, jedoch nicht so ausgeprägt wie bei Nikjoo et al. Dies beruht auf unterschiedlichen Normierungen.

Analog zu den SSB_c wird das Verhältnis der DSB_c berechnet und in den Abbildungen 33a-d dargestellt. Hier ist zu sehen, dass für $\theta = 0$ keine DSB_c gebildet werden. Ebenfalls gehen die Induktionsraten komplexer Schäden für niedrig-LET-Strahlung gegen null. Die Simulationen von Nikjoo et al. lassen auf ca. 20 % DSB_c für niedrig-LET-Strahlung schließen. Auf den ersten Blick sieht es aus, dass der LET-abhängige Anstieg der DSB_c mit einem θ zwischen 0.33 und 0.67 am besten mit dem Modell von Nikjoo et al. verträglich ist, für $\theta = 1$ sieht dieser hingegen zu stark aus. Es ist ziemlich deutlich sichtbar, dass für $\theta = 0$ beide inkompatibel sind. Bei einer genaueren Betrachtung beider Methoden sieht man, dass die Schadensinduktion der DSB_c mit der Methode der amorphen Bahnstruktur eher bei höheren LET liegt und der Anteil der DSB^+ höher ist, während weniger DSB^{++} vorhanden sind.

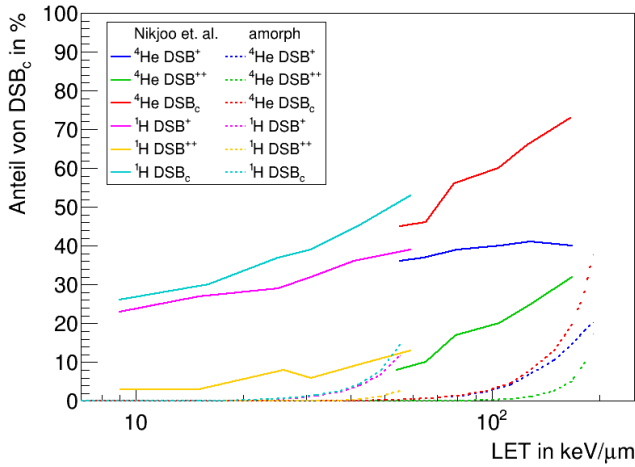
Der auffälligste Unterschied zwischen diesen beiden Methoden ist, dass bei Nikjoo et al. im Grenzfall von niedrig-LET-Strahlung die Induktionsraten komplexer DNA-Schäden um die 10 - 20 % ausmachen, während diese bei der Berechnung mit der amorphen Bahnstruktur gegen Null gehen. Der LET-abhängige Anstieg der SSB_c und DSB_c sieht in beiden Modellen qualitativ ähnlich für $\theta = 0.66$ und $\theta = 1$ aus.



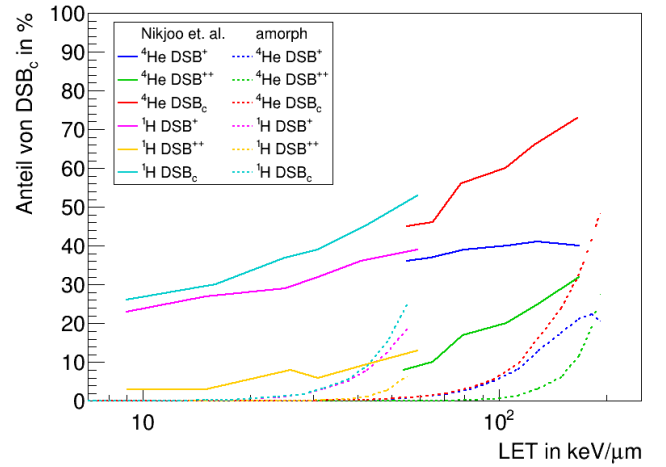
(a) $\theta = 0$



(b) $\theta = 1/3$



(c) $\theta = 2/3$



(d) $\theta = 1$

Abbildung 33: Vergleich der DSB- und DSB_c-Anteile zwischen den Daten von Nikjoo et al. aus Ref. [36] und der Methode der amorphen Bahnstruktur. Die durchgezogenen Linien stellen Ergebnisse aus Ref. [36] dar: Anteil der DSB nach Bestrahlung mit Helium (blau), der DSB_c (grün), Anteil der DSB nach Bestrahlung mit Protonen (rot) und DSB_c (magenta) als Funktion des LET. Die gestrichelten Linien stellen die Ergebnisse der Rechnung mit Hilfe der amorphen Bahnstruktur für verschiedene Anteile zwischen dem direkten und indirekten Effekt $\theta = 0$ (Abb. a), $\theta = 1/3$ (Abb. b), $\theta = 2/3$ (Abb. c) und $\theta = 1$ (Abb. d) dar.

5.2 Diskussion

Im Folgenden werden die Ergebnisse diskutiert, welche sich mit der Beschreibung der Dosisverteilung von Ionenspuren durch die amorphe Bahnstruktur befassen, sowie die Relevanz der Größenordnung von DNA-Schadensclustern.

5.2.1 Optimierung der amorphen Bahnstruktur zur Vorhersage der RBE von Kohlenstoffstrahlung

Im LEM wird die physikalische Dosis der Ionenspuren mit einer zweidimensionalen Gaußverteilung gefaltet, um die Radikaldiffusion vereinfacht nachzubilden. Es wird untersucht, ob eine Auflösung nach direktem und indirektem Effekt die RBE von Kohlenstoffbestrahlung besser beschreibt als die Vereinfachung. Der Anteil des direkten Beitrags wird über den θ -Parameter ($\theta \in [0, 1]$) ausgedrückt. Der θ -Parameter beeinflusst die Höhe des RBE-Maximums und den LET-Wert des Maximums sowie die RBE im Eingangskanal. Mit höheren θ steigt der Wert des RBE-Maximums und das RBE-Maximum verschiebt sich zu niedrigerem LET. Außerdem erhöht sich die RBE für die niedrigen LET-Werte des Eingangskanals. Die beste Übereinstimmung mit den Daten erhält man für θ -Parameter im Bereich von $1/3$ bis $2/3$. Damit lässt sich die RBE_α im Eingangskanal besser als mit $\theta = 0$ beschreiben und die Vorhersage verläuft durch den Mittelwert der Daten. Die RBE_{10} wird ebenfalls mit einem θ -Parameter im Bereich von $1/3$ bis $2/3$ besser beschrieben; oberhalb eines LET von $60 \text{ keV}/\mu\text{m}$ verläuft die Vorhersage durch die Datenpunkte, unterhalb werden diese jedoch unterschätzt.

Die Änderung der maximalen Ausdehnung des inneren Spurradius r_c auf 3 nm zeigt ähnliche Effekte wie die Erhöhung des θ auf $1/3$, wobei sich der LET, bei dem das RBE-Maximum liegt, nicht ändert. Die RBE_α und RBE_{10} werden im Eingangskanal jedoch besser beschrieben (Abb. 30c, 30d). Die beste Beschreibung erhält man hier für θ -Parameter von 0 bis $1/3$. Da der LET-Wert des Maximums jedoch der gleiche bleibt und höher als in den Daten ist, ist eine Optimierung beider Parameter erforderlich. Ein innerer Spurradius r_c von 3 nm scheint zu klein gewählt, da die Ergebnisse dafür mit einem θ -Parameter von 0 bis $1/3$ am besten beschrieben werden. Der theoretisch erwartete θ -Parameter liegt im Bereich von $1/3$ bis $2/3$ und ist damit ohne Änderung des r_c im gleichen Bereich der Untersuchung. Für Photonenstrahlung wird ein relativer Beitrag des direkten Effekts von $1/3$ und für Ionenstrahlung von bis zu $2/3$ erwartet [38], [39]. In Verbindung dazu stellt sich auch die Frage, ob der θ -Parameter konstant im gesamten LET-Bereich ist oder sich ändert. Dahinter steht wiederum die Frage, ob der Beitrag des direkten Effekts LET-abhängig ist oder ob sich bei gleichem relativen Verhältnis der Komponenten die biologische Wirksamkeit verändert.

Der Einfluss der Modifikationen der θ - und r_c -Parameter auf die RBE-Vorhersage sollte daraufhin untersucht werden, ob eine Modifikation dieser Parameter dazu beitragen, die systematische Diskrepanz zwischen den Daten und der LEM Rechnung zu erklären bzw. zu verringern. Die hier vorgestellte Methode ist ein guter Kandidat dafür. Es wird gezeigt, dass die aktuelle Form der Dosisverteilung $\theta = 0$ angepasst werden müsste, da eine Rechnung mit $\theta = 2/3$ eine bessere Beschreibung der Daten im Bereich des RBE-Maximums als auch im Eingangskanal zeigt.

Die grundlegende Schwierigkeit solcher Optimierungen beruht darauf, dass es für radiale Abstände innerhalb der Ionenspur unterhalb von 100 nm keine experimentellen Messungen gibt. Entsprechend gibt es viele unterschiedliche Theorien, mit verschiedenen Ansätzen, die versuchen die amorphe Bahnstruktur

zu modellieren. Deswegen wurde im LEM die Beschreibung der amorphen Bahnstruktur mit jeder Version angepasst, um Daten besser beschreiben zu können [11]–[14]. Die Untersuchung von Elsässer et al. [34] wertete für LEM-III verschiedene Modelle der amorphen Bahnstruktur aus. Die Ergebnisse zeigten, dass viele der untersuchten Modelle in Verbindung mit dem LEM die RBE von Kohlenstoffionen angemessen beschreiben können. Manche Modelle der amorphen Bahnstruktur sind jedoch mit Übergangsdosen des LQL-Modells verbunden, welche offensichtlich mit Überlebenskurven nach Photonenbestrahlung unverträglich sind. Es wurde letztlich das Modell gewählt, welches sich aufgrund theoretischer Grundlagen motivieren lässt und die Daten beschreibt. Ein direkter Vergleich der Ergebnisse von Elsässer et al. und denen dieser Arbeit ist nicht ohne Weiteres möglich, da die ältere LEM-III-Version verwendet wurde. Es kann immer nur die Kombination einer LEM-Variante und eines Modells der amorphen Bahnstruktur ausgewertet werden. Das liegt daran, dass der lokale Effekt nur in Kombination mit einem Modell der amorphen Bahnstruktur vorhergesagt werden kann. Die LEM-Variante und die amorphe Bahnstruktur haben einen gewissen Blackbox-Charakter, die so aufeinander abgestimmt sind, dass ihre Kombination die Daten beschreibt. In diesem Kontext ist ebenfalls die Untersuchung in dieser Arbeit (Kap. 5.1.1) zu verstehen. Es handelt sich um eine Methode, die auf Grundlage von theoretischen Überlegungen eingeführt wird. Mit dieser ist es möglich, die untersuchten Daten besser zu beschreiben als mit der vorhergehenden Methode. Daraus lässt sich jedoch im Umkehrschluss nicht folgern, dass diese Methode eine bessere Beschreibung der physikalischen Dosis darstellt.

5.2.2 Amorphe Bahnstruktur als Näherung der mikroskopischen Dosisverteilung und die Relevanz der Schadensclusterung auf der μm -Skala

Die hier durchgeführten Untersuchungen bezüglich der amorphen Bahnstruktur als Näherung der Dosisverteilung betreffen zwei Aspekte: zum einen die Gültigkeit der Annahme, dass die mikroskopische Dosisverteilung angemessen durch die amorphe Bahnstruktur beschrieben wird, und zum anderen, welches die relevante Größenskala für die biologisch wirksame Clusterung von DNA-Schäden ist. Da die amorphe Bahnstruktur die mittlere lokale Dosis der Ionenspuren betrachtet, ist es zum einen denkbar, dass der Mittelwert keine adäquate Näherung der zugrunde liegenden Dosisverteilung für die nachfolgenden Simulationsschritte ist. Zum anderen, dass die amorphe Bahnstruktur eine zu starke Vereinfachung darstellt, sodass mit einer detaillierteren Beschreibung der Dosisverteilung genauere Vorhersagen möglich wären [77]. Bei der relevanten Größenordnung der DNA-Schadensclusterung gibt es verschiedene Ansätze, diese gehen von der nm-Skala [18]–[23] bis hin zur μm -Skala [3], [4], [11]–[15], [68], sowie dazwischen liegende Größenordnungen [69], [70], [115]. Aufgrund der Unterschiede in den verglichenen Modellen lassen sich diese zwei Aspekte nur schwer isoliert betrachten. Dies liegt im Wesentlichen daran, dass Modelle, die sich auf die DNA-Schadensclusterung auf der nm-Skala fokussieren, die Dosisdeposition durch *ab initio* Simulationen vorhersagen. Bei den betrachteten DNA-Schäden handelt es sich auch hier um SSB und DSB sowie deren Clusterung. Typischerweise werden im Kontext des Zellüberlebens nur die DSB betrachtet, da diese den für das Überleben relevanten Schaden darstellen [54], [55]. Da die Rolle der SSB_c nicht gänzlich geklärt ist, werden diese im Folgenden auch betrachtet. Es ist jedoch denkbar, dass diese ebenfalls einen Beitrag zur Strahlenwirkung leisten, wenn sie sich z. B. in andere Schadensarten umwandeln.

Bei dieser Untersuchung wird als erstes geprüft, ob die vorhergesagte Induktionsrate von DNA-Schadensclustern auf der nm-Skala grundsätzliche Unterschiede zu einem vierdimensionalen Transportmodell aufweist. Dieser Aspekt ist wichtig, da die typischen Modelle (KURBUC, PARTRAC, MSA, Geant4-DNA), welche detailliertere Beschreibungen der Ionisationsprozesse fordern, in ihren Kalkulationen DNA-Schadenscluster auf der nm-Skala untersuchen. Die Definitionen dieser sind entweder zu der von Nikjoo et al. identisch oder zumindest ähnlich. Somit stellen ähnliche Induktionsraten dieser DNA-Schäden ähnliche physikalische Endpunkte und Ausgangspunkte für die biologische Modellierung dar.

Die Untersuchung der DNA-Schadensinduktionsraten auf der nm-Skala (Kap. 5.1.2) zeigt als auffälligsten Unterschied zwischen den Ergebnissen von Nikjoo et al. [36] und der amorphen Bahnstruktur, dass bei der amorphen Bahnstruktur für niedrige LET weder SSB_c noch DSB_c gebildet werden. Dies ist keine grundlegende Eigenschaft der amorphen Bahnstruktur, sondern liegt an der konkreten Umsetzung dieser im LEM. Dabei werden 1250 SSB pro Gy und 30 DSB pro Gy für Photonenstrahlung induziert. Komplexere Schäden entstehen durch Schadensclusterung unabhängiger Ionisationen. Diese tritt auf der nm-Skala bei hohen Dosen oder hohen LET auf. Es ist jedoch wahrscheinlicher, dass korrelierte Ionisationen lokal eine unterschiedliche Anzahl an Strangbrüchen induzieren, welche in unterschiedlichen Ausprägungen der SSB und DSB resultieren. Demzufolge sollten ähnlich viele SSB^+ wie DSB induziert werden. Dabei handelt es sich um gleich viele Strangbrüche, jedoch mit unterschiedlicher Aufteilung zwischen den Strängen. Die im LEM verwendeten Werte beruhen auf experimentellen Messungen [116], [117]. Diese Messungen diskriminieren jedoch nicht zwischen einfachen SSB/DSB und deren komplexen Varianten. Ebenso existiert keine einheitliche Zuordnung, bei welchem Abstand zwei SSB auf gegenüberliegenden Seiten einen DSB formieren. Ließen sich die experimentell gemessenen SSB und DSB genauer bezüglich ihrer Komplexität aufspalten, bzw. hätte man eine gute Abschätzung bezüglich deren Verhältnisse, so ließe sich das ins LEM implementieren. Dadurch erhält man für niedrig-LET-Strahlung ein ähnliches Verhalten wie in der Arbeit von Nikjoo et al. vorgestellt wurde. Die LET-abhängige Zunahme der SSB_c und DSB_c , wird durch die Methode der amorphen Bahnstruktur mit den θ -Parameter von $1/3$ bis $2/3$, qualitativ ähnlich zu der Rechnung von Nikjoo et al. [36] beschrieben. Der θ -Parameterbereich von $1/3$ bis $2/3$ ist konsistent mit der Annahme des direkten und indirekten Effekt-Beitrags [38], [39] so wie zu der in Kapitel 5.1.1 vorgestellten Analyse. Die aktuell verwendete Bahnstruktur ($\theta = 0$) ist jedoch nicht in der Lage, die Clusterung der DNA-Schäden auf der nm-Skala zu beschreiben. Die Analyse in Kapitel 5.1.1 legt nahe, dass die Größe des inneren Spurradius ebenfalls eine wichtige Rolle spielt.

Die gemeinsamen Aspekte der Untersuchungen des Einflusses der Bahnstruktur auf die RBE-Vorhersage (Kap. 5.1.1) und die Berechnung von DNA-Schadensclustern auf der nm-Skala (Kap. 5.1.2) lassen sich nutzen, um die Beschreibung der Dosis durch die amorphe Bahnstruktur zu evaluieren. Die Erhöhung des direkten Anteils über die Erhöhung des θ -Parameters zeigt in beiden Untersuchungen ähnliche Effekte: zum einen eine Verschiebung des RBE-Maximums (Abb. 30) und zum anderen einen Anstieg der Schadenskomplexität zu niedrigerem LET (Abb. 32 und 33). Wie bereits erwähnt, lässt sich die Dosisverteilung auf der Größenskala der inneren Ionenspür ($\approx nm$) nicht messen. Die Form der im LEM verwendeten radialen Dosisverteilung (Kap. 2.3.3) ist ein heuristischer Ansatz. Die Ergebnisse aus Kapitel 5.1.1 deuten jedoch darauf hin, dass eine genauere Beschreibung der amorphen Bahnstruktur, unter

der expliziten Berücksichtigung des direkten und indirekten Anteils sowie eine Änderung des inneren Spurradius r_c , möglich ist. Überträgt man diese Erkenntnisse zusammen mit der bereits diskutierten Modifikation der Induktion von SSB_c/DSB_c bei niedrigen LET auf diese Analyse (Kap. 5.1.2), so würde man erwarten, dass die Simulationsmethode von Nikjoo et al. nur noch marginale Unterschiede der DNA-Schadensclusterung auf der nm-Skala zur amorphen Bahnstruktur aufweist. Zusammen deutet dies darauf hin, dass die Unterschiede zwischen beiden Modellen auf den Unsicherheiten der Dosisverteilung beruhen und nicht auf der Methode der amorphen Bahnstruktur an sich. Daraus wird geschlossen, dass die DNA-Schadenscluster auf ähnliche Weise durch die amorphe Bahnstruktur wie durch die *ab initio* Rechnung beschrieben werden. Weiterhin wird gefolgert, dass die amorphe Bahnstruktur in der Lage ist, DNA-Schadenscluster auf der nm-Skala, falls dies notwendig ist, zu beschreiben. Diese stellen Ausgangspunkte für die biologische Modellierung dar. Da durch beide Ansätze ähnliche Ausgangspunkte erzielt werden, wird geschlossen, dass die *ab initio* Modelle keine grundlegenden Vorteile gegenüber der amorphen Bahnstruktur in Bezug auf die Modellierung des Zellüberlebens liefern.

Je nach Anwendung und Anforderung gilt es bei der Modellierung verschiedene Aspekte abzuwägen, bevor sich für eine *ab initio* Methode oder für eine vereinfachte Methode, wie z. B. die amorphe Bahnstruktur, entschieden wird. Die *ab initio* Modelle berücksichtigen mehr Effekte, wodurch ein breiteres Spektrum zur Analyse der Strahlenwirkung zu Verfügung steht [77]. Andererseits gibt es keine Anhaltspunkte, ob alle simulierten Wirkungsquerschnitte richtig sind, da nur ein Teil experimentell überprüft können [29]. Alles zusammengenommen scheint die amorphe Bahnstruktur die bessere Wahl innerhalb des LEM zu sein, da es die bisher untersuchten Effekte im Wesentlichen wiedergeben werden können. Außerdem ist die amorphe Bahnstruktur ein viel einfacheres Konzept als die *ab initio* Modelle.

Relevante Größenskala der Schadensclusterung für das Zellüberleben

Die zu beantwortende Frage bleibt, ob die komplexen DNA-Schadenscluster auf der nm-Skala biologisch relevant sind, oder ob DNA-Schadensclusterung auf der μm -Skala den dominanten Beitrag liefert. Die Berücksichtigung der Schadenscluster auf nm-Skala werden in anderen Arbeiten [18], [19], [22], [23] über die Schwierigkeit einer korrekten DNA-Reparatur auf dieser Skala motiviert. Die vorgestellten Arbeiten von Nikjoo et al. [25], [35], [36], [56], [82]–[84] nutzen eine Methode zur Simulation von DNA-Schäden auf der nm-Skala. Die Dissertationen von F. Tommasino [106] und L. Herr [72] gaben bereits einen Ausblick auf deren Relevanz für das LEM. Diese Arbeit stellt eine konkrete Methode zur Simulation von DNA-Schadensclustern auf der nm-Skala vor. Es wird gezeigt, dass die amorphe Bahnstruktur das LET-abhängige Verhalten der SSB_c und DSB_c Induktionsraten beschreiben kann. Weiter wird vorgestellt, wie die Induktion der entsprechenden Schäden bei niedrigem LET in das LEM eingebaut werden kann.


Die komplexen DNA-Schäden auf der nm-Skala, wie in den Arbeiten von Nikjoo et al. [36] beschrieben, zeigen ihr Maximum im LET-Bereich der mit erhöhter RBE verbunden ist. Der Bereich des RBE-Maximums wird jedoch bereits gut durch das LEM beschrieben, ohne dass dieses die Bildung komplexer DNA-Schäden auf der nm-Skala explizit berücksichtigt⁷. Dies deutet darauf hin, dass die SSB_c und DSB_c unter normalen Zellkulturbedingungen keine effektverstärkende Wirkung aufweisen. Es ist jedoch denk-

⁷ Abgesehen von der Bildung zusätzlicher DSB, durch das Aufeinandertreffen zweier SSB auf gegenüberliegenden Strängen.

bar, dass diese Schäden unter bestimmten Umständen, wie z. B. hypoxischen Bedingungen, eine höhere Relevanz haben.

Andere Arbeiten zeigten, dass eine Verbindung zwischen der Induktionsrate von DNA-Schadensclustern auf der nm-Skala und dem Zellüberleben nach Ionenbestrahlung hergestellt werden kann [22], [23], [57]. Wie kürzlich beschrieben, ist die RBE-Zunahme mit einer Zunahme der komplexen DNA-Schäden auf der nm-Skala korreliert. Innerhalb des LEM führt eine LET-Zunahme zu einer erhöhten Bildung von DSB, durch eine SSB-Clusterung [12]–[15]. Ebenso führt eine LET-Zunahme zu einem erhöhten cDSB-Anteil (Daten nicht gezeigt). Damit besteht eine Korrelation zwischen dem RBE und der DNA-Schadensclusterung auf der μm -Skala. Folglich lässt sich die LET-abhängige RBE-Zunahme durch Schadenscluster beider Größenordnungen erklären. Eine Erklärung des Zellüberlebens nach Photonenbestrahlung über die DNA-Schadenscluster auf der nm-Skala ist jedoch nicht möglich. Die Ausbeuten der einfachen und komplexen DNA-Schäden auf der nm-Skala zeigt einen konstanten Verlauf bis ca. 1000 Gy. Dies kann als universelles Ergebnis interpretiert werden, da die Wahrscheinlichkeit zweier unabhängiger Schäden am gleichen Ort sehr klein ist. Demzufolge findet unterhalb von 1000 Gy keine nennenswerte *inter-track* Clusterung auf der nm-Skala statt. Überlebenskurven mehrfach bestrahlter Zellen legen nahe, dass quadratische Komponenten von Überlebenskurven auf der Interaktion von Schäden beruhen [118]. Folglich lassen sich Überlebenskurven nach Photonenbestrahlung nicht durch die Schadensclusterung auf der nm-Skala erklären. Das heißt, es muss eine Schadensclusterung auf einer größeren Skala – wie z. B. μm -Skala – berücksichtigt werden.

Nachdem ausführlich dargelegt wurde, dass komplexe DNA-Schadenscluster auf der nm-Skala unter Standardbedingungen keine effektverstärkende Wirkung haben, die nicht auch durch DNA-Schadenscluster auf der μm -Skala erklärt wird, soll nun die Relevanz der DNA-Schadenscluster auf der μm -Skala diskutiert werden. Die Untersuchungsbefunde mit dem GLOBLE-Modell und LEM zeigten, dass das Konzept der zwei Schadensklassen auf der 2 Mbp Skala die Strahlenwirkung auf Zellen gut beschreibt [3], [4], [14], [15]. Weiterhin zeigte die Arbeit von L. Herr [72], dass eine kinetische Erweiterung dieses Konzepts in der Lage ist, Zeit-Dosis-Effekte von hoch- und niedrig-LET-Strahlung zu beschreiben. Die Arbeit von F. Tommasino [106] befasste sich mit DNA-Fragmentgrößen nach Bestrahlung. Diese kam zu dem Schluss, dass das Zellüberleben nicht ohne eine Berücksichtigung der DSB auf einer Chromatinstruktur der Größenordnung von Mbp beschrieben werden kann. Die genaue Größe bzw. Größenverteilung der zugrundeliegenden Chromatinstruktur kann allerdings nicht ohne Weiteres bestimmt werden. Andere Arbeiten [45], [119] stellten ebenfalls fest, dass eine höhere Ordnung der Chromatinstruktur empfindlich gegenüber DSB-Clustern ist. Das MKM [67] verfolgt einen zum LEM und GLOBLE ähnlichen Ansatz, indem die spezifische Energie pro Domäne, einer ähnlichen Größe wie die Chromatin-Loops, ausgewertet wird. Ebenfalls werden DNA-Schäden in zwei nicht genauer spezifizierten Schadensklassen auf der μm -Skala eingeteilt, wodurch eine Vorhersage der RBE nach hoch-LET-Strahlung möglich ist. In dieser Arbeit wird ebenfalls an vielen Stellen gezeigt, dass das GLOBLE-Modelle und LEM viele Effekte ionisierender Strahlung über ein weites LET-Spektrum meist quantitativ oder zumindest qualitativ gut beschreiben können. Das Neue an dieser Arbeit ist der Transfer der Zellzyklusspezifischen Radiosensitivität von niedrig- zu hoch-LET-Strahlung. Damit können Zusammenhänge zwischen DNA-Reparaturwegverfügbarkeit, niedrig- und hoch-LET-Strahlung, spezifische



Defizite der DNA-Reparaturwege und dem Zellüberleben hergestellt werden. Deshalb wird weiterhin angenommen, dass die Clusterung von DSB auf der Größenordnung von 2 Mbp (≈ 540 nm) die relevante Eigenschaft zur Beschreibung der Strahlenwirkung ist.



In dieser Arbeit werden verschiedene Ansätze zur Modellierung der Dosis-Effekt-Beziehungen ionisierender Strahlung vorgestellt. Das GLOBLE-Modell kann Zellüberleben in Abhängigkeit der Reparaturwegverfügbarkeit für niedrig-LET-Strahlung, bzw. Photonenstrahlung, vorhersagen. Eine Auswertung der GLOBLE-Modell-Überlebensvorhersagen synchroner Zellen nach Photonenbestrahlung ergibt zelllinienspezifische Unterschiede in der zellzyklusspezifischen Radiosensitivität. CHO-Zellen zeigen die höchste Resistenz gegenüber Photonenstrahlung in der späten S-Phase, während V79-Zellen diese bereits in der frühen bis mittleren S-Phase aufzeigen. Das GLOBLE-Modell sagt die späte S-Phase als die resistanteste Phase vorher. Entsprechend zeigt der Modell-Daten-Vergleich eine gute Übereinstimmung für CHO-Zellen, für V79-Zellen ergeben sich jedoch systematische Abweichungen. Der zeitabhängige Verlauf des Überlebens wird für beide Zelllinien in Grundzügen wiedergegeben. Das neu vorgestellte GLOBLE-MS-Modell nimmt an, dass die frühreplizierte DNA wichtiger für das Zellüberleben ist als die spätreplizierte. Damit können die systematischen Unterschiede in der zellzyklusspezifischen Radioresistenz von V79-Zellen beschrieben werden. Zelllinienspezifische Unterschiede in der zellzyklusspezifischen Radiosensitivität stellen einen interessanten Ansatzpunkt für weitere Forschung dar. Das ist von besonderem Interesse, da z. B. CHO- und V79-Zelllinie beide chinesischen Hamstern entstammen, jedoch unterschiedliche Ausprägungen in der zellzyklusspezifischen Radiosensitivität zeigen. Ein besseres Verständnis der zugrundeliegenden Mechanismen sollte dazu beitragen, gewebespezifische Unterschiede der Radiosensitivität innerhalb eines Organismus zu erklären. Ebenso können experimentelle Untersuchungen der Reparaturwegverfügbarkeit, wie schon von S. Lerchl [91] durchgeführt, dazu beitragen, zelllinienspezifische Unterschiede der Radiosensitivität aufzuklären.

Eine GLOBLE-Modellvorhersage ist, dass Zellen in S-Phase sensibler gegenüber hohen Dosen Photonenstrahlung sind als Zellen in G1-Phase. Zur Überprüfung dieser Vorhersage wurden Experimenten mit CHO-Zellen durchgeführt. Diese Vorhersage konnte zwar nicht bestätigt werden, es ist jedoch denkbar, dass der vorhergesagte Effekt bei höheren Dosen eintritt. Die durchgeführten Experimente ergeben, dass das Zellüberleben nach Photonenstrahlung bis ca. 15 Gy durch das GLOBLE-Modell beschrieben werden kann. In diesem Zusammenhang wurde die Form von Überlebenskurven nach Hochdosisbestrahlung mit Photonen untersucht. Dafür wird das Überleben asynchroner Zellen mithilfe des GLOBLE-Modells aus dem Überleben synchroner Zellen – und vice versa – vorhergesagt. Die Vorhersage des Überlebens asynchroner Zellen aus dem synchroner Zellen ist mit systematischen Unsicherheiten verbunden, eröffnet jedoch konzeptionell neue Anwendungen. So können Überlebenskurven asynchroner Zellen als eine Summe von Überlebenskurven synchroner Zellen betrachtet werden. Es ist bereits bekannt, dass Zellüberlebenskurven aufgrund der heterogenen Radiosensitivitäten der Subpopulationen bei hohen Dosen von einer LQ-Form in eine rein lineare Form übergehen [5]–[10]. In dieser Arbeit wird zum ersten Mal ein mechanistischer Erklärungsansatz für die zelllinienspezifische Übergangsdosis vorgestellt. Es wird gezeigt, dass die Übergangsdosis von den LQ-Parametern der Überlebenskurven bei niedrigen Dosen abhängt. Anders als andere Publikationen [5]–[7] legt diese Arbeit, anhand von experimentellen Daten, nahe, dass die Überlebenskurven der Subpopulationen keine reine LQ-Form aufweisen, sondern ebenfalls einer LQL-Form folgen.

Basierend auf dem GLOBLE-Modell werden ebenfalls zwei Methode entwickelt, um das Zellüberleben innerhalb des LEM bei hohen Dosen Photonenstrahlung auswerten zu können. Diese berücksichtigen zum einen den Übergang in eine lineare Kurvenform bei hohen Dosen und zum anderen, dass das LEM eine Dosiseffektkurve in Form einer LQL-Kurve als Input benötigt. Die Annahme, dass die maximale Steigung im linearen Bereich proportional zum DNA-Gehalt ist (Extrapolation-A) führt zu einer besseren Verträglichkeit mit Daten als die Annahme, dass die maximale Steigung für alle Zellzyklusphasen konstant ist (Extrapolation-B). Dies stützt die im vorherigen Absatz genannte Annahme, dass Zellen in S-Phase sensibler gegenüber hohen Dosen Photonenbestrahlung sein könnten als in G1-Phase.

In dieser Arbeit wird das LEM zum ersten mal benutzt, um Überlebenskurven synchroner Zellen nach Ionenbestrahlung vorherzusagen. Dafür werden Überlebenskurven synchroner Zellen nach Photonenbestrahlung als Input benutzt, welche durch das GLOBLE-Modell vorhergesagt werden. Die LEM-Überlebensvorhersage für synchrone Zellen nach Ionenbestrahlung gibt die systematischen Zusammenhänge zwischen hoch-LET-Strahlung und Dosisabhängigkeit der experimentell ermittelten Zellüberlebenskurven richtig wieder. Weiterhin zeigt der Vergleich zu experimentellen Daten, dass der Übergang von einer Resistenz der Zellen in S-Phase nach Photonenbestrahlung zu einer Sensibilisierung nach Ionenbestrahlung in der richtigen Größenordnung wiedergegeben wird. Bei der quantitativen Beschreibung des Überlebens gibt es allerdings Abweichungen; das Überleben wird bis zu einem Faktor von 2 bis 3 unterschätzt.

Bisher wurden das LEM benutzt, um die RBE asynchroner Zellen nach Ionenbestrahlung vorherzusagen. Dabei stellt die Überlebenskurve der asynchronen Zellen den Mittelwert einer heterogenen Zellpopulation dar. In dieser Arbeit wird untersucht, ob eine Vorhersage aus der Summe der Überlebenskurven der Subpopulationen das gleiche systematische Verhalten aufweisen wie die konventionelle Methode. Im Modell-Modell-Vergleich zur konventionellen Methode führt die Berücksichtigung der Subpopulationen, abgesehen von unterschiedlichen RBE-Maxima, zu keinen offensichtlichen systematischen Abweichungen der LET-abhängigen RBE-Kurvenform. Für eine bessere Übereinstimmung der Modelle sind weitere Untersuchungen des Übergangs von zellzyklusspezifischen Dosiseffektkurven vom Niedrig- und Hochdosisbereich sowie von nieder- und hoch-LET-Bereich erforderlich.

Die Vorhersage von Überlebenskurven synchroner Zellen aus den von asynchroner Zellen wird auch angewendet, um den Einfluss von Reparaturdefiziten der NHEJ- und HR-Reparaturwege auf das Überleben asynchroner Zellen vorherzusagen. Der Einfluss der Reparaturdefizite kann mithilfe des GLOBLE-Modells auf das Zellüberleben nach Photonenbestrahlung modelliert und mit dem LEM auf das Zellüberleben nach Ionenbestrahlung übertragen werden. Ein Modell-Daten-Vergleich zeigt, dass die Kombination des GLOBLE-Modells und des LEM den Einfluss von Reparaturdefiziten für hoch- und niedrig-LET-Strahlung beschreiben kann. Zusätzlich kann die Größenordnung einzelnen Einflüsse trotz Unsicherheiten vorhergesagt werden. Dadurch eignet sich die Kombination des GLOBLE-Modells und des LEM als erste Näherung zur Quantifizierung der Auswirkung von Reparaturdefiziten auf das Zellüberleben. Dies eröffnet Möglichkeiten für medizinische Anwendungen.

Neben dem Transfer des biologischen Effekt von Photonenstrahlung auf Ionenstrahlung wird in dieser Arbeit untersucht inwieweit sich die physikalischen Eigenschaften der Ionenstrahlung durch die der Photonenstrahlung beschreiben lassen. Die Dosisdeposition im LEM wird durch die amorphe Bahn-

struktur beschrieben, die Beiträge des direkten und indirekten Effekts werden auf vereinfachte Weise betrachtet. Es wird eine vollständige Verschmierung des Strahleneffekts durch die Radikaldiffusion, welche den indirekten Effekt imitiert, angenommen. In dieser Arbeit wird untersucht, ob eine gewichtete Summe der beiden Beiträge zur amorphen Bahnstrukturen zu genaueren Vorhersagen führt. Es wird gezeigt, dass diese Methode zu einer besseren Übereinstimmung der RBE-Vorhersage durch das LEM von Kohlenstoffstrahlung mit Daten führt. Die so gewonnen RBE-Kurven beschreiben die LET-Abhängigkeit der Daten im Eingangskanal besser als die vorherige Methode. Durch eine Modifikation des maximalen inneren Spurradius der amorphen Bahnstruktur können die bisher beobachteten Diskrepanzen im Eingangskanal für den untersuchten Datensatz fast vollständig beseitigt werden. Dies zeigt, dass eine gezielte Optimierung der amorphen Bahnstruktur zu einer besseren Beschreibung der RBE im Eingangskanal führen kann.

Neben der Form der amorphen Bahnstruktur wird untersucht, ob diese generell eine angemessene Beschreibung von Ionenspuren darstellt. Es wird untersucht, inwieweit die Beschreibungen von Ionenspuren durch eine *ab initio* Monte-Carlo-Simulation [36] sich mit denen der amorphen Bahnstruktur vereinbaren lassen. Dafür wird die vorhergesagte DNA-Schadensclusterung auf der nm-Skala beider Ansätze verglichen. Damit kann gezeigt werden, dass beide Ansätze zu einer ähnlichen LET-Abhängigkeit der DNA-Schadensinduktionsraten führen. Eine Ausnahme bilden die Vorhersagen für niedrig-LET-Strahlung. Die *ab initio* Monte-Carlo-Simulation [36] sagt auch für diese Strahlenart komplexe DNA-Schadenscluster vorher, während die amorphe Bahnstruktur diese nur für höhere LET vorhersagt. Daher wird basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit eine Modifikation vorgeschlagen, mit der die amorphe Bahnstruktur die DNA-Schadensinduktionsraten auf der nm-Skala auch für niedrig-LET-Strahlung ähnlich zu der *ab initio* Monte-Carlo-Simulation [36] vorhersagen kann. Damit beruhen die sichtbaren Unterschiede beider Methoden auf Unsicherheiten der Dosisdeposition und nicht auf den Methoden an sich. Da beide Ansätze zu ähnlichen Schadensinduktionsraten führen, ist dies ein deutlicher Hinweis darauf, dass die amorphe Bahnstruktur zu keiner Übervereinfachung von Ionenspuren führt und angemessen für die Zellüberlebensvorhersage ist.

Im Zusammenhang der mikroskopischen Dosisdeposition wird untersucht, welche Größenordnung der DNA-Schadensclusterung für Zellüberlebensvorhersagen berücksichtigt werden müssen. Es wird dargelegt, dass die LET-abhängige Zunahme der komplexen DNA-Schadenscluster auf der μm -Skala mit der Zunahme von DNA-Schadensclustern auf der nm-Skala korreliert ist. Damit lässt sich die LET-Abhängigkeit der RBE über DNA-Schadenscluster auf beiden Längenskalen erklären. Das Zellüberleben nach Photonenbestrahlung kann jedoch nicht durch komplexe DNA-Schadenscluster auf der nm-Skala erklärt werden, aber über die auf der μm -Skala. Damit ist die Schadensclusterung der μm -Skala die relevante Größenskala zur Modellierung des Zellüberlebens nach niedrig- und hoch-LET-Bestrahlung. Eine zusätzliche Berücksichtigung der Schadenscluster auf der nm-Skala scheint vorerst nicht erforderlich zu sein.

Insgesamt wird in dieser Arbeit dargelegt, dass das Konzept zweier DSB-Klassen auf der μm -Skala zur Beschreibung der biologischen Strahlenwirkung geeignet ist. Andere Arbeiten [3], [4], [14], [15], [72], [106] kamen mit der Betrachtung anderer Eigenschaften ebenfalls auf das Ergebnis, dass die DNA-Schadensclusterung auf der μm -Skala die relevante Größenskala ist. Ein Argument dieser Arbeit dafür

ist, dass sich die Verknüpfung von DNA-Reparaturwegen und der DNA-Schadensklassen auf der μm -Skala nutzen lässt, um das Zellüberleben nach niedrig- und hoch-LET-Bestrahlung zu modellieren.

Im Laufe dieser Arbeit wird deutlich, dass die Extrapolation von Dosiseffektkurve zu hohen Dosen weiterer Optimierung bedarf. Das GLOBLE-Modell ist in der Lage, die Wirkung von Photonenstrahlung für Dosen von bis ca. 15 Gy zu beschreiben. Bei höheren Dosen treten jedoch deutliche Abweichungen auf. Zum einen sagt das GLOBLE-Modell zu starke Steigungen von Überlebenskurven vorher, wodurch das Überleben bei hohen Dosen unterschätzt wird. Zum anderen wird vorhergesagt, dass Zellen in S-Phase empfindlicher als die in G1-Phase werden, was in den untersuchten Daten jedoch nicht beobachtet werden konnte. Für diese Untersuchungen wurden Überlebenskurven synchroner und asynchroner CHO-Zellen nach hohen Dosen Photonenstrahlung aufgenommen. Um den Übergang zu Hochdosis sowie hoch-LET-Strahlung besser verstehen zu können, bietet es sich an, weitere Experimente mit höherer Dosis weiteren Positionen des Zellzyklus und anderen Zelllinien durchzuführen.

Letztendlich stellt diese Arbeit, ähnlich zu anderen Arbeiten auf diesem Gebiet, eine Verknüpfung zwischen den molekularen Strahlenschäden und dem Zellüberleben her. Ein Ziel dabei ist es, das Überleben aus dem Schadensmuster unabhängig davon wie dieses induziert wurde, vorherzusagen. Es wird gezeigt, dass eine Kombination des GLOBLE-Modells und des LEM in der Lage ist, dies zu leisten. Diese Art der Betrachtung soll dazu führen, dass keine strikte Trennung nach Strahlenqualität mehr notwendig ist. Dies soll es erlauben Dosis-Effekt-Beziehungen unterschiedlicher Strahlenqualitäten besser aufeinander beziehen, um die relevanten Effekte eingrenzen zu können. Daher stellt Diese Arbeit ein Konzept zur Verknüpfung unterschiedlicher Strahlenqualitäten, Synchronisationsqualitäten und Reparaturdefiziten vor. Dabei wird primär geprüft, ob die systematischen Zusammenhänge richtig wiedergegeben werden. Für genauere Vorhersagen bedarf es jedoch weitergehender Untersuchungen.

- [1] R. R. Wilson, "Radiological use of fast protons", *Radiology*, Bd. 47, Nr. 5, S. 487–491, Nov. 1946.
- [2] E. Fokas, G. Kraft, H. An und R. Engenhart-Cabillic, "Ion beam radiobiology and cancer: time to update ourselves", *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, Bd. 1796, Nr. 2, S. 216–229, 2009.
- [3] T. Friedrich, M. Durante und M. Scholz, "Modeling cell survival after photon irradiation based on double-strand break clustering in megabase pair chromatin loops", *Radiation Research*, Bd. 178, Nr. 5, S. 385–394, 2012.
- [4] A. Hufnagl, L. Herr, T. Friedrich, M. Durante, G. Taucher-Scholz und M. Scholz, "The link between cell-cycle dependent radiosensitivity and repair pathways: a model based on the local, sister-chromatid conformation dependent switch between nhej and hr", *DNA Repair*, Bd. 27, S. 28–39, März 2015.
- [5] L. D. Skarsgard, M. W. Skwarchuk und B. G. Wouters, "The survival of asynchronous v79 cells at low radiation doses: modeling the response of mixed cell populations.", *Radiation research*, Bd. 138, Nr. 1 Suppl, S72–5, Apr. 1994.
- [6] L. D. Skarsgard, M. W. Skwarchuk, B. G. Wouters und R. E. Durand, "Substructure in the radiation survival response at low dose in cells of human tumor cell lines.", *Radiation research*, Bd. 146, Nr. 4, S. 388–398, 1996.
- [7] R. B. Hawkins, "Survival of a mixture of cells of variable linear-quadratic sensitivity to radiation", *Radiation research*, Bd. 153, Nr. 6, S. 840–843, Juni 2000.
- [8] M. Astrahan, "Some implications of linear-quadratic-linear radiation dose-response with regard to hypofractionation.", *Medical physics*, Bd. 35, Nr. 9, S. 4161–4172, Aug. 2008.
- [9] M. Guerrero und X. A. Li, "Extending the linear-quadratic model for large fraction doses pertinent to stereotactic radiotherapy.", *Physics in Medicine and Biology*, Bd. 49, Nr. 20, S. 4825–4835, 2004.
- [10] C. Park, L. Papiez, S. Zhang, M. Story und R. D. Timmerman, "Universal survival curve and single fraction equivalent dose: useful tools in understanding potency of ablative radiotherapy", *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, Bd. 70, Nr. 3, S. 847–852, 2008.
- [11] M. Scholz, A. M. Kellerer, W. Kraft-Weyrather und G. Kraft, "Computation of cell survival in heavy ion beams for therapy", *Radiation and Environmental Biophysics*, Bd. 36, Nr. 1, S. 59–66, März 1997.
- [12] T. Elsässer und M. Scholz, "Cluster effects within the local effect model.", *Radiation research*, Bd. 167, Nr. 3, S. 319–29, März 2007.
- [13] T. Elsässer, M. Krämer und M. Scholz, "Accuracy of the local effect model for the prediction of biologic effects of carbon ion beams in vitro and in vivo.", *International journal of radiation oncology, biology, physics*, Bd. 71, Nr. 3, S. 866–72, Juli 2008.
- [14] T. Elsässer, W. K. Weyrather, T. Friedrich, M. Durante, G. Iancu, M. Krämer, G. Kragl, S. Brons, M. Winter, K.-J. Weber und M. Scholz, "Quantification of the relative biological effectiveness for ion beam radiotherapy: direct experimental comparison of proton and carbon ion beams and a novel approach for treatment planning.", *International journal of radiation oncology, biology, physics*, Bd. 78, Nr. 4, S. 1177–83, Nov. 2010.
- [15] T. Friedrich, U. Scholz, T. Elsässer, M. Durante und M. Scholz, "Calculation of the biological effects of ion beams based on the microscopic spatial damage distribution pattern", *International journal of radiation biology*, Bd. 88, Nr. 1-2, S. 103–107, 2012.

-
- [16] C. A. Tobias, E. A. Blakely, E. L. Alpen, J. R. Castro, E. J. Ainsworth, S. B. Curtis, F. Q. H. Ngo, A. Rodriguez, R. J. Roots, T. Tenford und T. C. H. Yang, "Molecular and cellular radiobiology of heavy ions", *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, Bd. 8, Nr. 12, S. 2109–2120, Dez. 1982.
- [17] P. Todd, J. C. Wood, J. T. Walker und S. J. Weiss, "Lethal, potentially lethal, and nonlethal damage induction by heavy ions in cultured human cells.", *Radiation research. Supplement*, Bd. 8, S5–S12, 1985.
- [18] J. F. Ward, "Biochemistry of dna lesions.", *Radiation research. Supplement*, Bd. 8, S. 103–111, 1985.
- [19] J. F. Ward, "The complexity of dna damage: relevance to biological consequences.", *International Journal of Radiation Biology*, Bd. 66, Nr. April, S. 427–432, 1994.
- [20] S. Malyarchuk, R. Castore und L. Harrison, "Apex1 can cleave complex clustered dna lesions in cells", *DNA Repair*, Bd. 8, Nr. 12, S. 1343–1354, Dez. 2009.
- [21] "Clustered dna lesion repair in eukaryotes: relevance to mutagenesis and cell survival", *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, Bd. 711, Nr. 1-2, S. 123–133, Juni 2011, ISSN: 00275107.
- [22] E. Surdutovich und A. V. Solov'Yov, in *AIP Conference Proceedings*, Bd. 1525, 2013, S. 672–678.
- [23] A. Verkhovtsev, E. Surdutovich, A. V. Solov'yov, K. Ando und A. M. Grumezescu, "Multiscale approach predictions for biological outcomes in ion-beam cancer therapy", *Scientific Reports*, Bd. 6, Nr. 1, S. 27 654, Sep. 2016.
- [24] B. Rydberg, "Clusters of dna damage induced by ionizing radiation: formation of short dna fragments. ii. experimental detection.", *Radiation research*, Bd. 145, Nr. 2, S. 200–9, Feb. 1996.
- [25] H. Nikjoo, P. O'Neill, M. Terrissol und D. T. Goodhead, "Quantitative modelling of dna damage using monte carlo track structure method", *Radiation and Environmental Biophysics*, Bd. 38, Nr. 1, S. 31–38, 1999.
- [26] "First steps towards systems radiation biology studies concerned with dna and chromosome structure within living cells", *Radiation and Environmental Biophysics*, Bd. 47, Nr. 1, S. 49–61, Feb. 2008.
- [27] M. Bernal, M. Bordage, J. Brown, M. Davidková, E. Delage, Z. El Bitar, S. Enger, Z. Francis, S. Guatelli, V. Ivanchenko, M. Karamitros, I. Kyriakou, L. Maigne, S. Meylan, K. Murakami, S. Okada, H. Payno, Y. Perrot, I. Petrovic, Q. Pham, A. Ristic-Fira, T. Sasaki, V. Štěpán, H. Tran, C. Villagrasa und S. Incerti, "Track structure modeling in liquid water: a review of the geant4-dna very low energy extension of the geant4 monte carlo simulation toolkit", *Physica Medica*, Bd. 31, Nr. 8, S. 861–874, Dez. 2015.
- [28] W. Friedland, E. Schmitt, P. Kunderát, M. Dingfelder, G. Baiocco, S. Barbieri und A. Ottolenghi, "Comprehensive track-structure based evaluation of dna damage by light ions from radiotherapy-relevant energies down to stopping", *Scientific Reports*, Bd. 7, S. 45 161, März 2017.
- [29] H. Nikjoo, S. Uehara, D. Emfietzoglou und F. A. Cucinotta, "Track-structure codes in radiation research", *Radiation Measurements*, Bd. 41, Nr. 9-10, S. 1052–1074, 2006.
- [30] M. Scholz, "Effects of ion radiation on cells and tissues", in *Radiation Effects on Polymers for Biological Use*, Bd. 162, Springer, 2003, S. 95–155.
- [31] J. Kiefer und H. Straaten, "A model of ion track structure based on classical collision dynamics.", *Physics in medicine and biology*, Bd. 31, Nr. 11, S. 1201–1209, Nov. 1986.
- [32] A. Chatterjee und H. J. Schaefer, "Microdosimetric structure of heavy ion tracks in tissue", *Radiation and Environmental Biophysics*, Bd. 13, Nr. 3, S. 215–227, Sep. 1976.

-
- [33] Y. Kase, T. Kanai, N. Matsufuji, Y. Furusawa, T. Elsässer und M. Scholz, “Biophysical calculation of cell survival probabilities using amorphous track structure models for heavy-ion irradiation”, *Physics in Medicine and Biology*, Bd. 53, Nr. 1, S. 37–59, Jan. 2008.
- [34] T. Elsässer, R. Cunrath, M. Krämer und M. Scholz, “Impact of track structure calculations on biological treatment planning in ion radiotherapy”, *New Journal of Physics*, Bd. 10, Nr. 7, S. 075 005, Juli 2008.
- [35] H. Nikjoo, P. O’Neill, D. T. Goodhead und M. Terrissol, “Computational modelling of low-energy electron-induced dna damage by early physical and chemical events.”, *International journal of radiation biology*, Bd. 71, Nr. 5, S. 467–483, Mai 1997.
- [36] H. Nikjoo, P. O’Neill, W. E. Wilson und D. T. Goodhead, “Computational approach for determining the spectrum of dna damage induced by ionizing radiation.”, *Radiation research*, Bd. 156, Nr. 5 Pt 2, S. 577–83, Nov. 2001.
- [37] D. Schardt, T. Elsässer und D. Schulz-Ertner, “Heavy-ion tumor therapy: physical and radiobiological benefits”, *Reviews of Modern Physics*, Bd. 82, Nr. 1, S. 383–425, Feb. 2010.
- [38] R. Roots und S. Okada, “Protection of dna molecules of cultured mammalian cells from radiation-induced single-strand scissions by various alcohols and sh compounds”, *Int.J.Radiat.Biol.*, Bd. 21, Nr. 4, S. 329–342, Apr. 1972.
- [39] R. Hirayama, A. Ito, M. Tomita, T. Tsukada, F. Yatagai, M. Noguchi, Y. Matsumoto, Y. Kase, K. Ando, R. Okayasu und Y. Furusawa, “Contributions of direct and indirect actions in cell killing by high-let radiations.”, *Radiation research*, Bd. 171, Nr. 2, S. 212–218, 2009.
- [40] T. R. Munro, “The relative radiosensitivity of the nucleus and cytoplasm of chinese hamster fibroblasts”, *Radiation Research*, Bd. 42, Nr. 3, S. 451–470, Juni 1970.
- [41] E. J. Hall und A. J. Giaccia, *Radiobiology for the Radiologist*. Lippincott Williams & Wilkins, 2006.
- [42] J. H. Houtgraaf, J. Versmissen und W. J. van der Giessen, “A concise review of dna damage checkpoints and repair in mammalian cells”, *Cardiovascular Revascularization Medicine*, Bd. 7, Nr. 3, S. 165–172, Juli 2006.
- [43] G. Felsenfeld und M. Groudine, “Controlling the double helix”, *Nature*, Bd. 421, Nr. 6921, S. 448–453, Jan. 2003.
- [44] H. Yokota, G. Van Den Engh, J. E. Hearst, R. K. Sachs und B. J. Trask, “Evidence for the organization of chromatin in megabase pair-sized loops arranged along a random walk path in the human g0/g1 interphase nucleus”, *Journal of Cell Biology*, Bd. 130, Nr. 6, S. 1239–1249, 1995.
- [45] P. J. Johnston, S. H. Macphail, J. P. Banath und P. L. Olive, “Chromatin structure-dependent repair of dna double- strand breaks : factors affecting elution of dna from nucleoids¹”, *Radiation Research*, Bd. 149, Nr. 6, S. 533–542, Juni 1998.
- [46] R. Sachs, G. Van Den Engh, B. Trask, H. Yokota und J. Hearst, “A random-walk / giant-loop model for interphase chromosomes”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Bd. 92, Nr. March, S. 2710–2714, März 1995.
- [47] J. Ostashevsky, “A polymer model for large-scale chromatin organization in lower eukaryotes.”, *Molecular biology of the cell*, Bd. 13, Nr. 6, S. 2157–69, Juni 2002.
- [48] N. Rhind und D. M. Gilbert, “Dna replication timing”, *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, Bd. 5, Nr. 8, S. 1–26, 2013.
- [49] D. Löb, N. Lengert, V. O. Chagin, M. Reinhart, C. S. Casas-Delucchi, M. C. Cardoso und B. Drosel, “3d replicon distributions arise from stochastic initiation and domino-like dna replication progression.”, *Nature communications*, Bd. 7, S. 11 207, 2016.

-
- [50] I. Hiratani, T. Ryba, M. Itoh, T. Yokochi, M. Schwaiger, C. W. Chang, Y. Lyou, T. M. Townes, D. Schübeler und D. M. Gilbert, "Global reorganization of replication domains during embryonic stem cell differentiation", *PLoS Biology*, Bd. 6, Nr. 10, S. 2220–2236, Okt. 2008.
- [51] D. M. MacAlpine, H. K. Rodríguez und S. P. Bell, "Coordination of replication and transcription along a drosophila chromosome", *Genes and Development*, Bd. 18, Nr. 24, S. 3094–3105, Dez. 2004.
- [52] C. Schmegner, H. Hameister, W. Vogel und G. Assum, "Isochores and replication time zones: a perfect match", *Cytogenetic and Genome Research*, Bd. 116, Nr. 3, S. 167–172, 2007.
- [53] I. Hiratani, S. ichiro Takebayashi, J. Lu und D. M. Gilbert, "Replication timing and transcriptional control: beyond cause and effect-part ii", *Current Opinion in Genetics and Development*, Bd. 19, Nr. 2, S. 142–149, 2009.
- [54] G. Iliakis, "The role of dna double strand breaks in ionizing radiation-induced killing of eukaryotic cells", *BioEssays*, Bd. 13, Nr. 12, S. 641–648, Dez. 1991.
- [55] P. L. Olive, "The role of dna single- and double-strand breaks in cell killing by ionizing radiation", *Radiation Research*, Bd. 150, Nr. 5, S42–S51, Nov. 1998.
- [56] D. E. Charlton, H. Nikjoo und J. L. Humm, "Calculation of initial yields of single- and double-strand breaks in cell nuclei from electrons, protons and alpha particles.", *International journal of radiation biology*, Bd. 56, Nr. 1, S. 1–19, Juli 1989.
- [57] R. Taleei, P. M. Girard und H. Nikjoo, "Dsb repair model for mammalian cells in early s and g1 phases of the cell cycle: application to damage induced by ionizing radiation of different quality", *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Bd. 779, S. 5–14, 2015.
- [58] M. Durante, J. S. Bedford, D. J. Chen, S. Conrad, M. N. Cornforth, A. T. Natarajan, D. C. van Gent und G. Obe, "From dna damage to chromosome aberrations: joining the break", *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Bd. 756, Nr. 1-2, S. 5–13, Aug. 2013.
- [59] E. Weterings und D. C. van Gent, "The mechanism of non-homologous end-joining: a synopsis of synopsis", *DNA Repair*, Bd. 3, Nr. 11, S. 1425–1435, Nov. 2004.
- [60] T. Helleday, J. Lo, D. C. van Gent und B. P. Engelward, "Dna double-strand break repair: from mechanistic understanding to cancer treatment", *DNA Repair*, Bd. 6, Nr. 7, S. 923–935, 2007.
- [61] Z. Mao, M. Bozzella, A. Seluanov und V. Gorbunova, "Dna repair by nonhomologous end joining and homologous recombination during cell cycle in human cells", *Cell Cycle*, Bd. 7, Nr. 18, S. 2902–2906, Sep. 2008.
- [62] A. V. Mazin, O. M. Mazina, D. V. Bugreev und M. J. Rossi, "Rad54, the motor of homologous recombination", *DNA Repair*, Bd. 9, Nr. 3, S. 286–302, März 2010.
- [63] T. T. Puck und P. I. Marcus, "Action of x-rays on mammalian cells", *Journal of Experimental Medicine*, Bd. 103, Nr. 5, S. 653–666, Mai 1956.
- [64] W. Kraft-Weyrather, *Überlebensdaten für synchronisierte und asynchrone zellen*, persönliche Kommunikation, Jan. 2015.
- [65] D. E. Lea u. a., "Actions of radiations on living cells.", *Actions of radiations on living cells.*, 1946.
- [66] C. A. Tobias, E. A. Blakely, F. Q. H. Ngo und T. C. H. Yang, "The repair-misrepair model of cell survival", in *Radiation Biology in Cancer Research*, 1980, S. 195–213.
- [67] R. B. Hawkins, "A microdosimetric-kinetic model of cell death from exposure to ionizing radiation of any let, with experimental and clinical applications.", *International journal of radiation biology*, Bd. 69, Nr. 6, S. 739–755, 1996.

- [68] S. B. Curtis, “Lethal and potentially lethal lesions induced by radiation — a unified repair model”, *Radiation Research*, Bd. 106, Nr. 2, S. 252, Mai 1986.
- [69] M. P. Carante, S. Altieri, S. Bortolussi, I. Postuma, N. Protti und F. Ballarini, “Modeling radiation-induced cell death: role of different levels of dna damage clustering.”, *Radiation and environmental biophysics*, Bd. 54, Nr. 3, S. 305–16, Aug. 2015. DOI: 10.1007/s00411-015-0601-x.
- [70] F. Ballarini, S. Altieri, S. Bortolussi, M. Carante, E. Giroletti und N. Protti, “The bianca model/code of radiation-induced cell death: application to human cells exposed to different radiation types”, *Radiation and Environmental Biophysics*, Bd. 53, Nr. 3, S. 525–533, Aug. 2014.
- [71] S. J. McMahon, J. Schuermann, H. Paganetti, K. M. Prise und a. W. Hsieh, “Mechanistic modelling of dna repair and cellular survival following radiation-induced dna damage”, *Scientific Reports*, Bd. 6, Nr. 1, S. 33 290, Dez. 2016.
- [72] L. Herr, “Modeling of time-dose-let effects in the cellular response to radiation”, Diss., Technische Universität, Juli 2015.
- [73] J. F. Fowler, “The linear-quadratic formula and progress in fractionated radiotherapy.”, *The British journal of radiology*, Bd. 62, Nr. 740, S. 679–94, Aug. 1989.
- [74] T. Friedrich, U. Scholz, T. Elsässer, M. Durante und M. Scholz, “Systematic analysis of rbe and related quantities using a database of cell survival experiments with ion beam irradiation”, *Journal of Radiation Research*, Bd. 54, Nr. 3, S. 494–514, 2013.
- [75] N. Hunter und C. R. Muirhead, “Review of relative biological effectiveness dependence on linear energy transfer for low-let radiations”, *Journal of Radiological Protection*, Bd. 29, Nr. 1, S. 5–21, März 2009.
- [76] J. J. Butts und R. Katz, “Theory of rbe for heavy ion bombardment of dry enzymes and viruses”, *Radiation Research*, Bd. 30, Nr. 4, S. 855, 1967.
- [77] F. A. Cucinotta, H. Nikjoo und D. T. Goodhead, “Applications of amorphous track models in radiation biology”, *Radiation and Environmental Biophysics*, Bd. 38, Nr. 2, S. 81–92, Juli 1999.
- [78] W. Friedland, P. Jacob und P. Kundrát, “Stochastic simulation of dna double-strand break repair by non-homologous end joining based on track structure calculations”, *Radiation Research*, Bd. 173, Nr. 5, S. 677–688, Mai 2010.
- [79] S. Agostinelli, J. Allison, K. Amako, J. Apostolakis, H. Araujo, P. Arce, M. Asai, D. Axen, S. Banerjee, G. Barrand, F. Behner, L. Bellagamba, J. Boudreau, L. Broglia, A. Brunengo, H. Burkhardt, S. Chauvie, J. Chuma, R. Chytrcek, G. Cooperman, G. Cosmo, P. Degtyarenko, A. Dell’Acqua, G. Depaola, D. Dietrich, R. Enami, A. Feliciello, C. Ferguson, H. Fesefeldt, G. Folger, F. Foppiano, A. Forti, S. Garelli, S. Giani, R. Giannitrapani, D. Gibin, J. Gómez Cadenas, I. González, G. Gracia Abril, G. Greeniaus, W. Greiner, V. Grichine, A. Grossheim, S. Guatelli, P. Gumplinger, R. Hamatsu, K. Hashimoto, H. Hasui, A. Heikkinen, A. Howard, V. Ivanchenko, A. Johnson, F. Jones, J. Kallenbach, N. Kanaya, M. Kawabata, Y. Kawabata, M. Kawaguti, S. Kelner, P. Kent, A. Kimura, T. Kodama, R. Kokoulin, M. Kossov, H. Kurashige, E. Lamanna, T. Lampén, V. Lara, V. Lefebure, F. Lei, M. Liendl, W. Lockman, F. Longo, S. Magni, M. Maire, E. Medernach, K. Minamimoto, P. Mora de Freitas, Y. Morita, K. Murakami, M. Nagamatsu, R. Nartallo, P. Nieminen, T. Nishimura, K. Ohtsubo, M. Okamura, S. O’Neale, Y. Oohata, K. Paech, J. Perl, A. Pfeiffer, M. Pia, F. Ranjard, A. Rybin, S. Sadilov, E. Di Salvo, G. Santin, T. Sasaki, N. Savvas, Y. Sawada, S. Scherer, S. Sei, V. Sirotenko, D. Smith, N. Starkov, H. Stoecker, J. Sulkimo, M. Takahata, S. Tanaka, E. Tcherniaev, E. Safai Tehrani, M. Tropeano, P. Truscott, H. Uno, L. Urban, P. Urban, M. Verderi, A. Walkden, W. Wander, H. Weber, J. Wellisch, T. Wenaus, D. Williams, D. Wright, T. Yamada, H. Yoshida und D. Zschesche, “Geant4—a simulation toolkit”, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research*

arch Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment, Bd. 506, Nr. 3, S. 250–303, 2003.

- [80] J. Allison, K. Amako, J. Apostolakis, H. Araujo, P. Arce Dubois, M. Asai, G. Barrand, R. Capra, S. Chauvie, R. Chytrcek, G. Cirrone, G. Cooperman, G. Cosmo, G. Cuttone, G. Daquino, M. Donszelmann, M. Dressel, G. Folger, F. Foppiano, J. Generowicz, V. Grichine, S. Guatelli, P. Gumplinger, A. Heikkinen, I. Hrivnacova, A. Howard, S. Incerti, V. Ivanchenko, T. Johnson, F. Jones, T. Koi, R. Kokoulin, M. Kossov, H. Kurashige, V. Lara, S. Larsson, F. Lei, O. Link, F. Longo, M. Maire, A. Mantero, B. Mascialino, I. McLaren, P. Mendez Lorenzo, K. Minamimoto, K. Murakami, P. Nieminen, L. Pandola, S. Parlati, L. Peralta, J. Perl, A. Pfeiffer, M. Pia, A. Ribon, P. Rodrigues, G. Russo, S. Sadilov, G. Santin, T. Sasaki, D. Smith, N. Starkov, S. Tanaka, E. Tcherniaev, B. Tome, A. Trindade, P. Truscott, L. Urban, M. Verderi, A. Walkden, J. Wellisch, D. Williams, D. Wright und H. Yoshida, “Geant4 developments and applications”, *IEEE Transactions on Nuclear Science*, Bd. 53, Nr. 1, S. 270–278, Feb. 2006.
- [81] T. Friedrich, M. Durante und M. Scholz, “Simulation of dsb yield for high let radiation”, *Radiation Protection Dosimetry*, Bd. 166, Nr. 1-4, S. 61, 2015.
- [82] W. E. Wilson und H. Nikjoo, “A monte carlo code for positive ion track simulation”, *Radiation and Environmental Biophysics*, Bd. 38, Nr. 2, S. 97–104, Juli 1999.
- [83] M. Terrissol, “Modelling of radiation damage by 125i on a nucleosome.”, *International journal of radiation biology*, Bd. 66, Nr. 5, S. 447–51, Nov. 1994.
- [84] D. E. Charlton, D. T. Goodhead, W. E. Wilson und H. G. Paretzke, “The deposition of energy in small cylindrical targets by high let radiations.”, *Radiation Protection Dosimetry*, Bd. 13, Nr. 1-4, S. 123–125, 1985.
- [85] A. M. Bothe, “Untersuchung der statistischen eigenschaften von zellüberlebenskurven und der relativen biologischen wirksamkeit von ionenstrahlung”, Masterarbeit, Goethe Universität Frakfurt am Main, 2016.
- [86] T. Friedrich, *Errors of survival data and rbe values*, interner Bericht, Dez. 2008.
- [87] G. I. Lang und A. W. Murray, “Mutation rates across budding yeast chromosome vi are correlated with replication timing”, *Genome Biology and Evolution*, Bd. 3, Nr. 1, S. 799–811, Sep. 2011.
- [88] C. L. Chen, A. Rappailles, L. Duquenne, M. Huvet, G. Guilbaud, L. Farinelli, B. Audit, Y. D'Aubenton-Carafa, A. Arneodo, O. Hyrien und C. Thermes, “Impact of replication timing on non-cpg and cpg substitution rates in mammalian genomes”, *Genome Research*, Bd. 20, Nr. 4, S. 447–457, Apr. 2010.
- [89] J. A. Stamatoyannopoulos, I. Adzhubei, R. E. Thurman, G. V. Kryukov, S. M. Mirkin und S. R. Sunyaev, “Human mutation rate associated with dna replication timing”, *Nat Genet*, Bd. 41, Nr. 4, S. 393–395, März 2009.
- [90] S. Lerchl, “Forschungs- und laborpraktikum, angefertigt gsi hellmholtzzentrum für schwerionenforschung, abteilung biophysik”, Praktikumsbericht, Goethe Universität Frankfurt am Main, 2016.
- [91] —, “Untersuchung der zellzyklusabhängigen strahlenempfindlichkeit bei hohen dosen sowie der räumlich-zeitlichen korrelation von dna-replikation und homologer rekombination während der s-phase”, Masterarbeit, Goethe Universität Frankfurt am Main, 2017.
- [92] J. Gray, F. Dolbeare, M. Pallavicini, W. Beisker und F. Waldman, “Cell cycle analysis using flow cytometry”, *International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry and Medicine*, Bd. 49, Nr. 2, S. 237–255, Jan. 1986.
- [93] J. V. Watson, S. H. Chambers und P. J. Smith, “A pragmatic approach to the analysis of dna histograms with a definable g1 peak”, *Cytometry*, Bd. 8, Nr. 1, S. 1–8, 1987.

-
- [94] E. B. Wilson, "Probable inference, the law of succession, and statistical inference", *Journal of the American Statistical Association*, Bd. 22, Nr. 158, S. 209–212, 1927.
- [95] L. D. Brown, T. T. Cai und A. DasGupta, "Interval estimation for a binomial proportion", *Statistical Science*, Bd. 16, Nr. 2, S. 101–117, 2001.
- [96] W. K. Weyrather, S. Ritter, M. Scholz und G. Kraft, "Rbe for carbon track-segment irradiation in cell lines of differing repair capacity.", *International journal of radiation biology*, Bd. 75, Nr. 11, S. 1357–1364, Jan. 1999.
- [97] M. Scholz, W. Kraft-Weyrather, S. Ritter und G. Kraft, "Cell cycle delays induced by heavy ion irradiation of synchronous mammalian cells", *Advances in Space Research*, Bd. 9, Nr. 10, S. 91–96, Jan. 1989.
- [98] E. Nasonova, S. Ritter, T. Fomenkova und G. Kraft, "Induction of chromosomal damage in cho-k1 cells and their repair-deficient mutant xrs5 by x-ray and particle irradiation.", *Advances in space research : The official journal of the Committee on Space Research (COSPAR)*, Bd. 22, Nr. 4, S. 569–78, Jan. 1998.
- [99] A. Takahashi, M. Kubo, H. Ma, A. Nakagawa, Y. Yoshida, M. Isono, T. Kanai, T. Ohno, Y. Furusawa, T. Funayama, Y. Kobayashi und T. Nakano, "Nonhomologous end-joining repair plays a more important role than homologous recombination repair in defining radiosensitivity after exposure to high-let radiation", *Radiation research*, Bd. 182, Nr. 3, S. 338–344, 2014.
- [100] P. K. Singhal, S. Sassi, L. Lan, P. Au, S. C. Halvorsen, D. Fukumura, R. K. Jain und B. Seed, "Mouse embryonic fibroblasts exhibit extensive developmental and phenotypic diversity.", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Bd. 113, Nr. 1, S. 122–7, Jan. 2016.
- [101] K. D. Mills, D. O. Ferguson, J. Essers, M. Eckersdorff, R. Kanaar und F. W. Alt, "Rad54 and dna ligase iv cooperate to maintain mammalian chromatid stability", *Genes and Development*, Bd. 18, Nr. 11, S. 1283–1292, Juni 2004.
- [102] J. F. Ziegler, M. D. Ziegler und J. P. Biersack, "Srim - the stopping and range of ions in matter (2010)", *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B*, Bd. 268, S. 1818–1823, Juni 2010. DOI: 10.1016/j.nimb.2010.02.091.
- [103] M. H. Salomo, "A range–energy program for relativistic heavy ions in the region $1 < e < 3000$ mev/amu", *LBL Report*, Bd. 10446, 1996.
- [104] G. Barendsen, T. Beusker, A. Vergroesen und L. Budke, "Effects of different ionizing radiations on human cells in tissue culture: ii. biological experiments", *Radiation Research*, Bd. 13, Nr. 6, S. 841–849, Dez. 1960.
- [105] G. Barendsen, "Mechanism of action of different ionizing radiations on the proliferative capacity of mammalian cells", *Theoretical and Experimental Biophysics (A. Cole, Ed.)*, Bd. 1, S. 167–231, 1967.
- [106] F. Tommasino, "Dna damage induction and processing following exposure to low and high let radiation : The role of micrometer-scale clustering in higher-order chromatin structures", Darmstadt, Techn. Univ., Diss., 2014, Diss., TU Darmstadt, 2014.
- [107] T. Helleday, E. Petermann, C. Lundin, B. Hodgson und R. A. Sharma, "Dna repair pathways as targets for cancer therapy", *Nature Reviews Cancer*, Bd. 8, Nr. 3, S. 193–204, 2008.
- [108] M. J. Gonzalez, J. R. Miranda-Massari, M. J. Berdiel, J. Duconge, J. L. Rodríguez-López, R. Hunninghake und V. J. Cobas-Rosario, "High dose intravenous vitamin c and chikungunya fever: a case report", *Journal of Orthomolecular Medicine*, Bd. 29, Nr. 4, S. 154–156, Mai 2014.
- [109] K. Durisova, B. Salovska, J. Pejchal und A. Tichy, "Chemical inhibition of dna repair kinases as a promising tool in oncology", *Biomedical Papers*, Bd. 160, Nr. 1, S. 11–19, Okt. 2016.

-
- [110] P. Hahnfeldt und L. Hlatky, "Resensitization due to redistribution of cells in the phases of the cell cycle during arbitrary radiation protocols.", *Radiation research*, Bd. 145, Nr. 2, S. 134–43, Feb. 1996.
- [111] G. W. Barendsen, C. Van Bree und N. A. Franken, *Importance of cell proliferative state and potentially lethal damage repair on radiation effectiveness: implications for combined tumor treatments (review)*. Aug. 2001.
- [112] T. M. Pawlik und K. Keyomarsi, "Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy", *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, Bd. 59, Nr. 4, S. 928–942, 2004.
- [113] Y. Furusawa, K. Fukutsu, M. Aoki, H. Itsukaichi, K. Eguchi-Kasai, H. Ohara, F. Yatagai, T. Kanai und K. Ando, "Inactivation of aerobic and hypoxic cells from three different cell lines by accelerated (3)he-, (12)c- and (20)ne-ion beams.", *Radiation research*, Bd. 154, Nr. 5, S. 485–496, Nov. 2000.
- [114] H. Nikjoo, P. O'Neill, M. Terrissol und D. T. Goodhead, "Modelling of radiation-induced dna damage: the early physical and chemical event.", *International journal of radiation biology*, Bd. 66, Nr. 5, S. 453–457, 1994.
- [115] F. Ballarini, S. Altieri, S. Bortolussi, M. Carante, E. Giroletti und N. Protti, "The role of dna cluster damage and chromosome aberrations in radiation-induced cell killing: a theoretical approach", *Radiation Protection Dosimetry*, Bd. 166, Nr. 1-4, S. 75–79, Sep. 2015.
- [116] M. Pinto und K. M. Prise, "A review of studies of ionizing break clustering", *Radiation research*, Bd. 156, Nr. 5, S. 572–576, Nov. 2012.
- [117] B. Stenerl w, K. H. Karlsson, B. Cooper und B. Rydberg, "Measurement of prompt dna double-strand breaks in mammalian cells without including heat-labile sites: results for cells deficient in nonhomologous end joining.", Bd. 159, Nr. 4, S. 502–510, Apr. 2003.
- [118] T. C. Stephens, J. J. Eady, J. H. Peacock und G. G. Steel, "Split-dose and low dose-rate recovery in four experimental tumour systems", *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med*, Bd. 52, Nr. 1, S. 157–170, Jan. 1987.
- [119] P. J. Johnston und P. E. Bryant, "A component of dna double-strand break repair is dependent on the spatial orientation of the lesions within the higher-order structures of chromatin.", *International journal of radiation biology*, Bd. 66, Nr. 5, S. 531–536, Jan. 1994.

2SSB	zwei SSB im Abstand 11 - 54 bp auf gegenüberliegenden DNA-Strängen
bp	Basenpaar
BIANCA	<i>Biophysical ANalysis of Cell death and chromosome Aberrations</i>
cDSB	geclusterter Doppelstrangbruch, d. h. zwei oder mehr DSB innerhalb eines Chromatin-Loop
CHO	Chinesische-Hamster-Eierstock-Zellen, engl.: Chinese Hamster Ovary
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol, Fluoreszenzfarbstoff für DNA
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSB	Doppelstrangbruch
DSB⁺	ein DSB und ein zusätzlicher SSB innerhalb eines DNA-Fragments der Größe 54 bp
DSB⁺⁺	zwei DSB innerhalb eines DNA-Fragments der Größe 54 bp
DSB_c	komplexe DSB auf der nm-Skala, DSB ⁺ und DSB ⁺⁺
double-Ko	MEF-Zellen mit Ligase 4 und Rad54 Knockout
Extrapolation-A	Extrapolation der Dosiseffektkurve synchroner Zellen unter der Annahme, dass die maximale Steigung proportional zum DNA-Gehalt ist.
Extrapolation-B	Extrapolation der Dosiseffektkurve synchroner Zellen unter der Annahme, dass die maximale Steigung konstant ist.
Gbp	Giga Basenpaare (= 10 ⁹ bp)
GLOBLE	<i>Giant LOP Binary LEsion</i>
Gy	Gray = J/kg
ε_{i,1}	Letalität, der durch NHEJ reparierten iDSB
ε_{i,2}	Letalität, der durch HR reparierten iDSB
ε_c	Letalität der cDSB
HR	homologe Rekombination, engl. <i>homologous recombination</i>
iDSB	isolierter Doppelstrangbruch, d. h. ein einzelner DSB innerhalb eines Chromatin-Loop
LEM	<i>Local Effect Model</i>
LET	<i>Linear Energy Transfer</i>
Lig4-Ko	MEF-Zellen mit Ligase 4 Knockout
LMDS	<i>Locally Multiple Damaged Sites</i>
LPL	<i>Lethal and Potentially Lethal</i>
LQ	linearquadratisch
LQL	linearquadratisch-linear
Mbp	Mega Basenpaar (= 10 ⁶ bp)
MEF	embryonische Mausfibroblasten, engl. <i>Mouse Embryonic Fibroblasts</i>
MKM	<i>Microdosimetric Kinetic Model</i>
NHEJ	<i>Non Homologous End Joining</i>
NTCP	Normalgewebekomplikationswahrscheinlichkeit, engl. <i>Normal Tissue Complication Probability</i>
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
Rad54-Ko	MEF-Zellen mit Rad54 Knockout
RBE	Relative Biologische Wirksamkeit, engl. <i>Relative Biological Effectiveness</i>
RMDS	<i>Regionally Multiple Damaged Sites</i>
RMR	<i>Repair-MisRepair</i>
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies, engl. <i>Reactive Oxygen Species</i>
SSB	Einzelstrangbruch, engl. <i>Single Strand Break</i>
SSB⁺	zwei SSB innerhalb von 54 bp auf dem gleichen DNA-Strang

SSB_c	komplexe SSB auf der nm-Skala, d. h. SSB ⁺ und 2SSB
SOBP	<i>Spread Out Bragg Peak</i>
TCP	Tumorkontrolle, engl. <i>Tumor Control Probability</i>
V79	Chinesische-Hamster-Lungenfibroblasten
wt	Wildtyp

Lebenslauf

Persönliche Informationen

Name Paul Günther
Geburtsdatum 05. Februar 1985
Geburtsort Karaganda in Kasachstan

Ausbildung

2005 Schulabschluss, Abitur
2006 - 2013 Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, Studiengang Physik, Abschluss Diplom
2014 - 2017 Doktorand an der Technischen Universität Darmstadt
Einsatzort: Biophysik der GSI Helmholtzzentrum für Schwerionenforschung GmbH

Veröffentlichungen im Zusammenhang dieser Arbeit

Konferenzbeiträge

- EACR Conference Series 2015, Radiation Biology and Cancer: From Molecular Response to the Clinic, "*Asynchronous survival in the cell cycle extended GLOBLE model*". Posterpräsentation.
- 18th Annual Meeting of the Society for Biological Radiation Research - GBS e.V., "*Modeling the cell-cycle specific survival after ion irradiation using the Local Effect Model*". Posterpräsentation.
- ERR 2016 AMSTERDAM, 42nd Conference of the European Radiation Research Society, "*Cell cycle dependent radiosensitivity at high doses: GLOBLE model predictions and experimental tests*". Posterpräsentation.

Wissenschaftliche Berichte

- P. Günther, A. Hufnagl, L. Herr, T. Friedrich, M. Durante, M. Scholz "*Prediction of asynchronous cell survival with the cell cycle extended GLOBLE model*". GSI, wissenschaftlicher Jahresbericht 2014.
- P. Günther, T. Friedrich, M. Durante, M. Scholz "*Cell survival-curve shapes of exponential growing cells based on cell-cycle specific survival-curves*". GSI, wissenschaftlicher Jahresbericht 2015.



Danksagung

An erster Stelle möchte ich denen danken, die mir die Promotion ermöglicht haben, dabei vor allem Prof. Dr. Marco Durante für die Betreuung der Arbeit und Dr. Michael Scholz als direkter Ansprechpartner. Sie haben es mir ermöglicht, schnell in diesem für mich neuem Thema Fuß zu fassen und unterstützten mich stets bei meiner Forschung.

Weiterhin möchte ich Prof. Dr. Barbara Drossel für das hilfreiche Feedback im Rahmen des Graduiertenkollegs und für die Begutachtung meiner Arbeit danken. Mein Dank geht ebenfalls an Dr. Thomas Friedrich, Dr. Rebecca Grün und die ganze Abteilung Biophysik der GSI für die nette Arbeitsumgebung. Sylvie Lerchl danke ich für die gute Zusammenarbeit im Labor und die freundliche Arbeitsatmosphäre. Weiterhin danke ich Dr. Wilma Kraft-Weyrather für das Zurverfügungstellen ihrer Daten zur Analyse und die vielen Gespräche fürs Verständnis der experimentellen Aspekte. Nadine Erbdinger und Kateryna Shreder danke ich für die Gespräche und den Austausch über Biologie und Physik. Christoph Schuy danke ich für die Gespräche über ROOT.

Ein großer Dank geht an die Mitglieder des Graduiertenkollegs, unter anderem Kiki und Fabian für den Austausch bei den Treffen. Christina Jochum und Patrick Wachenheim danke ich für die moralische Unterstützung während des Schreibens der Arbeit. Christoph Sauter und Martin Schanz danke ich für die vielen Gespräche bezüglich alternativer Anwendungen physikalischer Grundprinzipien. Außerdem danke ich allen meinen Freunden, die mich während der Promotion unterstützt haben.

Ein besonderer Dank geht an meine Familie für die Unterstützung während des gesamten Studiums und der Promotion.

